



# **Entwicklung eines *Rhodobacter*-basierten Systems zur Synthese wirtsfremder Proteine und Phospholipide**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Nadine Katzke**  
aus Oberhausen

Düsseldorf, Mai 2010

aus dem Institut für Enzymtechnologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich-Jäger  
Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Schurr

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2010

Meiner Familie

Was wir wissen, ist ein Tropfen –  
was wir nicht wissen, ein Ozean.

*(Isaac Newton)*

## **Veröffentlichungen während der Promotion**

**Katzke N, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Markert A, Svensson V, Jaeger KE, Heck A, Drepper T:** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif.* 2010; 69(2):137-46.

## **Patentanmeldungen**

**Drepper T, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Heck A, Jaeger KE, Katzke N, Markert A, Svensson V:** Verfahren und Vektor zur heterologen Genexpression. DE 10 2008 013 304.1, 2008

## **Posterpräsentationen auf internationalen Tagungen**

**Katzke N, Arvani S, Jaeger KE, Drepper T:** Heterologous protein expression in *Rhodobacter capsulatus* – Development of a novel T7 RNA polymerase based system. *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Frankfurt am Main, 2008

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Schurr danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Thomas Drepper danke ich für die engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit sowie für viele wertvolle Ratschläge und lehrreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Ulrich Schoerken von der Firma Cognis danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes und angeregte wissenschaftliche Diskussionen. Frau Brigitte Brügl danke ich für die Hilfe bei der Fettsäuren-Analytik.

Vera Svensson, Herrn Dr. Achim Heck, Frau Dr. Solmaz Arvani, sowie den Diplom-Biologen René Bergmann, Franco Circolone, Anita Loeschke, Janko Potzkei und Stefan Endres gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und dafür, dass die Arbeit mit dieser Arbeitsgruppe nie langweilig wurde.

Des weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des IMET für die schöne Zeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ferner danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und den Zuspruch während der gesamten Studienzeit sowie für ihr Interesse an meiner Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>  | <b>I</b>  |
| <b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>  | <b>V</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGEN .....</b>  | <b>IX</b> |
| <b>I EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1 Fettsäuren und Lipide .....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1 Biologische Quellen für Fettsäuren und Lipide.....  | 7         |
| 1.2 Bakterielle Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden.....                                     | 9         |
| 1.3 Fettsäuremodifizierende Enzyme.....   | 12        |
| 1.3.1 Fettsäure-Desaturasen.....  | 13        |
| 1.4 Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium.....                                      | 16        |
| <b>2 Die heterologe Genexpression.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 Potentielle Probleme bei der heterologen Expression in Mikroorganismen.....                 | 17        |
| <b>3 Das phototrophe Bakterium <i>R. capsulatus</i>.....</b>                                    | <b>20</b> |
| 3.1 Vorteile von <i>R. capsulatus</i> für die heterologe Expression.....                        | 21        |
| <b>4 Expressionssysteme.....</b>  | <b>23</b> |
| 4.1 T7-abhängige Expression.....  | 23        |
| <b>5 Ziele der Arbeit.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>II MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>1 Bakterienstämme .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2 Plasmide.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>3 Oligonukleotide.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>4 Nährmedien und Zusätze .....</b>   | <b>30</b> |
| 4.1 Sterilisation von Nährmedien und Zusätzen.....  | 30        |
| 4.2 <i>E. coli</i> Medien.....  | 31        |
| 4.3 <i>R. capsulatus</i> Medien.....  | 31        |
| 4.4 <i>Synechocystis</i> Medium.....  | 33        |
| 4.5 <i>Arthrospira platensis</i> Medium.....  | 33        |
| 4.6 <i>Stappia aggregata</i> Medium.....  | 34        |
| 4.7 Antibiotika.....  | 35        |
| <b>5 Antikörper und Enzyme.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>6 Puffer und Lösungen .....</b>  | <b>35</b> |
| 6.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....                                   | 35        |
| 6.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....                   | 36        |
| 6.3 Puffer und Lösungen für die Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese..... | 36        |
| 6.4 Puffer und Lösungen für Immunoblotting (Western Blot).....                                  | 37        |
| 6.5 Nachweis von Proteinen durch Färbereaktionen.....   | 38        |

## Inhaltsverzeichnis

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 6.6        | Puffer zur Aufreinigung löslicher Proteine .....   | 38        |
| 6.7        | Resuspensionspuffer .....  | 39        |
| 6.8        | Lösungen zur quantitativen Bestimmung von Proteinmengen .....  | 39        |
| 6.9        | Lösungen zur gaschromatographischen Analyse .....  | 39        |
| <b>7</b>   | <b>Chemikalien.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>8</b>   | <b>Reaktions- und Nachweis-Kits.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>9</b>   | <b>Geräte und Materialien .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>10</b>  | <b>Mikrobiologische Methoden.....</b>  | <b>43</b> |
| 10.1       | Bakterienanzucht.....  | 43        |
| 10.1.1     | Anzucht von <i>E. coli</i> .....   | 43        |
| 10.1.2     | Anzucht von <i>R. capsulatus</i> .....   | 43        |
| 10.1.3     | Anzucht von cyanobakteriellen Organismen .....   | 44        |
| 10.1.4     | Anzucht von <i>Stappia aggregata</i> .....   | 44        |
| 10.2       | Konjugativer Transfer mobilisierbarer Plasmide von <i>E. coli</i> nach <i>R. capsulatus</i> .....            | 44        |
| 10.3       | Erzeugung von Gefrierkulturen.....   | 45        |
| 10.4       | Bestimmung der optischen Dichte .....  | 45        |
| 10.5       | Aufschluss von Zellen mittels French Press.....  | 45        |
| 10.6       | Präparation von Zellfraktionen.....  | 46        |
| <b>11</b>  | <b>Genetische Methoden.....</b>  | <b>46</b> |
| 11.1       | Ligation von DNA-Fragmenten .....  | 46        |
| 11.2       | Transformation.....  | 47        |
| 11.2.1     | Herstellung transformationskompetenter Zellen.....   | 47        |
| 11.2.2     | Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....                                   | 47        |
| 11.3       | Präparation von Plasmid-DNA.....   | 47        |
| 11.4       | Methoden zur Charakterisierung von DNA .....   | 48        |
| 11.4.1     | Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....   | 48        |
| 11.4.2     | Agarosegelelektrophorese.....  | 48        |
| 11.4.3     | DNA-Konzentrationsbestimmung .....   | 48        |
| 11.5       | Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....   | 49        |
| 11.6       | Präparation genomischer DNA .....  | 49        |
| 11.7       | Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | 49        |
| 11.8       | Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....  | 50        |
| <b>12</b>  | <b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>   | <b>51</b> |
| 12.1       | Präparation von Proteinproben für SDS-Gele.....  | 51        |
| 12.2       | Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....   | 51        |
| 12.3       | Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....  | 51        |
| 12.4       | Immunodetektion von Proteinen .....  | 52        |
| 12.5       | Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen .....  | 53        |
| 12.6       | Aufreinigung von löslichen Proteinen über .....  | 53        |
| 12.7       | Bradford-Test zur quantitativen Bestimmung von Proteinmengen .....   | 53        |
| <b>13</b>  | <b>Biophysikalische Methoden.....</b>  | <b>54</b> |
| 13.1       | <i>In vivo</i> -Fluoreszenzmessung .....   | 54        |
| 13.2       | Gaschromatographische Analyse von Fettsäure-Methylestern .....   | 54        |
| <b>III</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>1</b>   | <b>Charakterisierung und Erweiterung des <i>R. capsulatus</i>-basierten Expressionssystems .....</b>         | <b>57</b> |
| 1.1        | Modulation der Expression von Zielgenen durch die Induktorkonzentration .....                                | 57        |
| 1.2        | Vergleich der Expressionseffizienz für YFP in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 und <i>E. coli</i> BL21(DE3)..... | 61        |
| 1.3        | Untersuchungen proteasedefizienter Stämme von <i>R. capsulatus</i> .....                                     | 65        |
| 1.3.1      | Expression von YFP in <i>lon</i> -defizienten Stämmen von <i>R. capsulatus</i> .....                         | 66        |
| 1.3.2      | Expression von YFP in <i>hslV</i> -defizienten Stämmen von <i>R. capsulatus</i> .....                        | 68        |
| 1.3.3      | Expression von YFP in <i>clpP</i> -defizienten Stämmen von <i>R. capsulatus</i> .....                        | 69        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>2</b>  | <b>Modifikation der Zusammensetzung der bakteriellen Membran von <i>R. capsulatus</i></b>   | <b>72</b>  |
| 2.1       | Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i>  | 72         |
| 2.1.1     | Die natürliche Membranzusammensetzung von <i>R. capsulatus</i>  | 73         |
| 2.1.2     | Optimierung der Aufnahme exogener Fettsäuren durch <i>R. capsulatus</i>   | 76         |
| 2.1.2.1   | Einfluss von Detergenzien auf die Aufnahme ungesättigter Fettsäuren   | 76         |
| 2.1.2.2   | Effizienz der Aufnahme exogener Fettsäuren als freie Fettsäuren und Natriumsalze  | 79         |
| 2.1.2.3   | Der Effekt von Cerulenin  | 83         |
| 2.1.3     | Einbau verschiedener exogener Fettsäuren in die Zellmembran von <i>R. capsulatus</i>  | 89         |
| 2.1.3.1   | Assimilation exogener <i>cis</i> -Vaccensäure aus dem Kulturmedium  | 90         |
| 2.1.3.2   | Assimilation exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium  | 93         |
| 2.1.3.3   | Assimilation exogener Linolsäure aus dem Kulturmedium   | 95         |
| 2.1.3.4   | Assimilation exogener konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium  | 98         |
| 2.1.3.5   | Assimilation exogener Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure  | 100        |
| 2.1.4     | Inhibition der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren durch die Deletion von <i>fabB</i>  | 103        |
| 2.1.4.1   | Effekt der Mutation auf die Membranzusammensetzung des Stammes <i>R. capsulatus</i> B10S- $\Delta$ <i>fabB</i>  | 104        |
| 2.1.4.2   | Aufnahme exogener Fettsäuren durch den Stamm <i>R. capsulatus</i> B10S- $\Delta$ <i>fabB</i>  | 107        |
| 2.2       | Heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen   | 109        |
| 2.2.1     | Konstruktion der Expressionsplasmide  | 111        |
| 2.2.2     | Heterologe Expression der Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i>   | 112        |
| 2.2.2.1   | Einfluss der Expressionszeit auf die Ausbeute heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i> BL21(DE3)   | 112        |
| 2.2.2.2   | Einfluss des Kulturmediums und des Expressionsstammes auf die Ausbeute heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i>                                      | 115        |
| 2.2.2.3   | Lokalisationsstudien zu heterologen Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i> BL21(DE3)   | 118        |
| 2.2.2.4   | Aktivität von Fettsäure-Desaturasen nach Überexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)   | 120        |
| 2.2.3     | Heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i>   | 123        |
| 2.2.3.1   | Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 unter phototrophen Expressionsbedingungen  | 124        |
| 2.2.3.2   | Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 unter aeroben Expressionsbedingungen   | 127        |
| 2.2.3.3   | Aktivität heterolog exprimierter Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7  | 128        |
| 2.2.3.4   | Nachweis der Transkriptionseffizienz für Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> und <i>E. coli</i> durch RT-PCR  | 128        |
| <b>IV</b> | <b>DISKUSSION</b>   | <b>131</b> |
| <b>1</b>  | <b>Die Expressionseigenschaften des Stammes <i>R. capsulatus</i> B10S-T7</b>  | <b>131</b> |
| 1.1       | Lässt sich die Expressionsleistung von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 durch die Induktorkonzentration modulieren?   | 131        |
| 1.2       | Welche Syntheseleistung kann mit <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 erreicht werden?  | 133        |
| 1.3       | Welchen Effekt hat die Deletion von Proteasegenen auf die Überexpression in <i>R. capsulatus</i> ?  | 134        |
| <b>2</b>  | <b>Assimilation exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium</b>  | <b>136</b> |
| 2.1       | Kann <i>R. capsulatus</i> exogene Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufnehmen?  | 137        |
| 2.2       | Welche physiologischen Effekte bewirkt die Aufnahme von Fettsäuren in der Zelle?  | 138        |
| 2.3       | Werden die aufgenommenen Fettsäuren in die Phospholipide der Bakterien eingebaut?   | 140        |
| 2.4       | Welchen Effekt hat das Antibiotikum Cerulenin auf die Aufnahme exogener Fettsäuren durch <i>R. capsulatus</i> ?   | 142        |
| 2.5       | Welchen Effekt hat die Mutation $\Delta$ <i>fabB</i> auf <i>R. capsulatus</i> ?   | 143        |
| 2.5.1     | Wie wirkt sich die Mutation auf die Membranzusammensetzung von <i>R. capsulatus</i> aus?  | 144        |
| 2.5.2     | Wie wirkt sich die Mutation $\Delta$ <i>fabB</i> auf die Aufnahme exogener Fettsäuren durch <i>R. capsulatus</i> aus?   | 145        |
| <b>3</b>  | <b>Heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen</b>  | <b>147</b> |
| 3.1       | Lassen sich heterologe Fettsäure-Desaturasen funktionell in <i>E. coli</i> exprimieren?   | 147        |
| 3.2       | Sind die in <i>E. coli</i> exprimierten Fettsäure-Desaturasen aktiv?  | 148        |
| 3.3       | Lassen sich die Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> exprimieren?  | 149        |
| 3.3.1     | Ist die Expression der Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> auf der Ebene der Transkription oder Translation weniger effizient als in <i>E. coli</i> ? | 150        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>V</b>    | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | <b>154</b> |
| <b>VI</b>   | <b>SUMMARY</b> .....   | <b>155</b> |
| <b>VII</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....  | <b>156</b> |
| <b>VIII</b> | <b>ANHANG</b> .....  | <b>182</b> |
| 1.          | Ausbeuten der Fettsäuremethylester bei den gaschromatographischen Analysen ..... | 182        |
| 2.          | Codon-Usage-Auswertung .....   | 193        |
| 3.          | Karten der verwendeten und erzeugten Plasmide .....                              | 197        |
| 4.          | Sequenzen der Fettsäure-Desaturase-Gene .....                                    | 205        |

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis:

|   |    |
|---|----|
| Abb. I-1: Membran-Bilayer und Phospholipide.....  | 5  |
| Abb. I-2: Fettsäurebiosynthese in <i>E. coli</i> .....  | 10 |
| Abb. I-3: Desaturierungsreaktion.....   | 13 |
|   |    |
| Abb. III-1: Expression von YFP in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 in Abhängigkeit der Fruktose-Konzentration.....  | 59 |
| Abb. III-2: Überexpression von YFP in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....   | 63 |
| Abb. III-3: Überexpression von YFP in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....   | 64 |
| Abb. III-4: Überexpression von YFP in <i>lon</i> -defizienten Stämmen von <i>R. capsulatus</i> .....  | 67 |
| Abb. III-5: Überexpression von YFP in <i>hslV</i> -defizienten Stämmen von <i>R. capsulatus</i> .....   | 70 |
| Abb. III-6: Überexpression von YFP in <i>clpP</i> -defizienten Stämmen von <i>R. capsulatus</i> .....   | 70 |
| Abb. III-7: Natürliche Membranzusammensetzung von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....   | 75 |
| Abb. III-8: Einfluss von Detergenzien auf die Aufnahme exogener Ölsäure durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 .....  | 75 |
| Abb. III-9: Aufnahme verschiedener Ölsäure-Derivate aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....  | 81 |
| Abb. III-10: Aufnahme verschiedener Linolsäure-Derivate aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....  | 81 |
| Abb. III-11: Inhibierung des Wachstums von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 durch das Antibiotikum Cerulenin.....   | 85 |
| Abb. III-12: Auswirkungen des Antibiotikums Cerulenin auf die Fettsäure-Zusammensetzung der Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....   | 85 |
| Abb. III-13: Einfluss der Konzentration von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Ölsäure durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....   | 87 |
| Abb. III-14: Effekt exogener <i>cis</i> -Vaccensäure auf das Wachstum Cerulenin-inhibierter Kulturen von <i>R. capsulatus</i> .....   | 91 |
| Abb. III-15: Auswirkungen von Cerulenin auf die Fettsäurenkomposition der Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 nach Kultivierung in Gegenwart exogener <i>cis</i> -Vaccensäure..... | 91 |
| Abb. III-16: Komplementation der wachstumsinhibierenden Wirkung von Cerulenin durch Aufnahme exogener Ölsäure .....   | 94 |
| Abb. III-17: Auswirkungen von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> .....   | 94 |

|  |     |
|--|-----|
| Abb. III-18: Komplementation des wachstumsinhibierenden Effekts von Cerulenin durch die Aufnahme exogener Linolsäure.....                                    | 97  |
| Abb. III-19: Auswirkungen von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Linolsäure aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....                    | 97  |
| Abb. III-20: Aufnahme von konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> .....  | 99  |
| Abb. III-21: Wirkung von Cerulenin auf die Aufnahme von EPA und DHA aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> .....                                    | 101 |
| Abb. III-22: Membranzusammensetzung des Stamms <i>R. capsulatus</i> B10S- $\Delta$ <i>fabB</i> im Vergleich mit dem Stamm <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....  | 106 |
| Abb. III-23: Aufnahme exogener Ölsäure und Linolsäure aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> B10S- $\Delta$ <i>fabB</i> .....                       | 108 |
| Abb. III-24: Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Expressionsplasmide für Fettsäure-Desaturasen am Beispiel des Plasmids pRhotHi-2- <i>BsdesA</i> ..... | 111 |
| Abb. III-25: Einfluss der Expressionsdauer auf die Akkumulation heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....                           | 114 |
| Abb. III-26: Einfluss des Kulturmediums und Expressionsstammes auf die Überexpression der heterologen Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i> .....          | 117 |
| Abb. III-27: Lokalisation heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....   | 119 |
| Abb. III-28: Veränderungen in der Membran von <i>E. coli</i> BL21(DE3) durch die heterologe Expression aktiver Fettsäure-Desaturasen.....                    | 122 |
| Abb. III-29: Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 unter anaeroben Bedingungen.....                                   | 126 |
| Abb. III-30: Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 unter aeroben Wachstumsbedingungen.....                            | 126 |
| Abb. III-31: Vergleich der Transkriptionslevel der heterologen Fettsäure-Desaturasen in <i>R. capsulatus</i> und <i>E. coli</i> .....                        | 130 |
| Abb. VII-1: Seltene Codons im Gen <i>ApdesC</i> anhand der Codon-Usage von <i>E. coli</i> .....  | 193 |
| Abb. VII-2: Seltene Codons im Gen <i>ApdesC</i> anhand der Codon-Usage von <i>E. coli</i> (Fortsetzung) ....   | 194 |
| Abb. VII-3: Seltene Codons im Gen <i>ApdesC</i> anhand der Codon-Usage von <i>R. capsulatus</i> .....  | 195 |
| Abb. VII-4: Seltene Codons im Gen <i>ApdesC</i> anhand der Codon-Usage von <i>R. capsulatus</i> (Fortsetzung).....   | 196 |

**Tabellenverzeichnis:**

|  |           |
|--|-----------|
| Tab. I-1: Übersicht über wichtige Fettsäuren.....  | 4         |
| <b>Tab. II-1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....</b>  | <b>26</b> |
| Tab. II-2: Verwendete Plasmide.....  | 27        |
| Tab. II-3: Verwendete Primer .....   | 28        |
| Tab. II- 4: Verwendete Antibiotika.....  | 35        |
| Tab. II- 5: Verwendete Chemikalien.....  | 40        |
| Tab. II- 6: Verwendete Geräte.....   | 42        |
| <br>   |           |
| Tab. III-1: Ausbeuten der Fettsäuremethylester aus natürlichen Membranen von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....   | 73        |
| Tab. III-2: Übersicht über die zur heterologen Expression ausgewählten Fettsäure-Desaturasen.....  | 110       |
| <br>   |           |
| Tab. IV-1: Abweichung der wirtseigenen Codon-Usage von der Codon-Usage der ursprünglichen Wirte der Fettsäure-Desaturasen.....   | 151       |
| <br>   |           |
| Tab. VII-1: Ausbeuten der Fettsäuremethylester aus Membranen von <i>R. capsulatus</i> nach der Aufnahme von Ölsäure als freier Ölsäure und Ölsäure-Natriumsalz.....          | 182       |
| Tab. VII-2: Ausbeuten der Fettsäuremethylester aus Membranen von <i>R. capsulatus</i> nach der Aufnahme von Linolsäure als freier Linolsäure und Linolsäure-Natriumsalz..... | 183       |
| Tab. VII-3: Veränderungen in der Fettsäuren-Zusammensetzung der Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 durch Cerulenin.....  | 183       |
| Tab. VII-4: Der Effekt von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....  | 184       |
| Tab. VII-5: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran nach der Aufnahme exogener cis-Vaccensäure aus dem Kulturmedium durch <i>R. capsulatus</i> B10S-T7.....        | 185       |
| Tab. VII-6: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von <i>R. capsulatus</i> nach der Aufnahme exogener Ölsäure. Standardabweichungen in Klammern.....             | 185       |
| Tab. VII-7: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S-T7 nach der Aufnahme exogener Linolsäure.....                                    | 185       |
| Tab. VII-8: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in Membranen von <i>R. capsulatus</i> nach der Aufnahme konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium.....                     | 187       |
| Tab. VII-9: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von <i>R. capsulatus</i> nach der Aufnahme exogener EPA und DHA I.....   | 188       |
| Tab. VII-10: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von <i>R. capsulatus</i> nach der Aufnahme exogener EPA und DHA.....  | 189       |

|   |     |
|---|-----|
| Tab. VII-11: Ausbeuten der Fettsäure-Spezies in <i>R. capsulatus</i> B10S- $\Delta fabB$ im Vergleich mit dem Wildtyp <i>R. capsulatus</i> B10S-T7..... | 190 |
| Tab. VII-12: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von <i>R. capsulatus</i> B10S- $\Delta fabB$ nach Aufnahme von exogenen Fettsäuren. .... | 191 |
| Tab. VII-13: Veränderungen in der <i>E. coli</i> Membran durch die Fettsäure-Desaturasen <i>BsDesA</i> und <i>SaDesA</i> . ....                         | 192 |

## Abkürzungen

|                       |   |
|-----------------------|---|
| A                     | Ampere  |
| Abb.                  | Abbildung                                       |
| A. dest.              | Aqua destillata (destilliertes Wasser)          |
| <i>ApDesC/ ApdesC</i> | Enzym/ Gen der <i>A. platensis</i> Desaturase C |
| <i>ApDesD/ ApdesD</i> | Enzym/ Gen der <i>A. platensis</i> Desaturase D |
| APS                   | Ammoniumpersulfat                               |
| bp                    | Basenpaare                                      |
| <i>BsDesA/ BsdesA</i> | Enzym/ Gen der <i>B. subtilis</i> Desaturase A  |
| °C                    | Grad Celsius                                    |
| ca.                   | circa   |
| Da                    | Dalton  |
| DMSO                  | Dimethylsulfoxid                                |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure                          |
| dNTP                  | 2'-Desoxynukleotid-5'triphosphat                |
| EDTA                  | Ethylendiamintetraacetat                        |
| Fe                    | Eisen   |
| g                     | Gramm   |
| GC                    | Gaschromatographie                              |
| G/C-Gehalt            | Gehalt einer DNA an Guanosin und Cytosin        |
| GFP                   | grün fluoreszierendes Protein                   |
| Gm                    | Gentamycin                                      |
| h                     | Stunde(n)                                       |
| His <sub>6</sub>      | 6x Histidin                                     |
| HRP                   | Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) |
| ICM                   | intracytoplasmatische Membran                   |
| IPTG                  | Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid                    |
| kb                    | Kilobasenpaare                                  |
| kDa                   | Kilo-Dalton                                     |
| Km                    | Kanamycin                                       |
| kPa                   | Kilopascal                                      |
| l                     | Liter   |
| LB                    | Luria Bertani                                   |
| M                     | Molar (mol/ Liter)                              |
| mA                    | Milliampere                                     |
| Mb                    | Megabasenpaare                                  |
| MCS                   | Multiple Cloning Site                           |
| min                   | Minute(n)                                       |
| ml                    | Milliliter                                      |
| mM                    | Millimolar                                      |

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| mRNA               | messenger-RNA                                    |
| MW                 | Molekulargewicht                                 |
| µg                 | Mikrogramm                                       |
| µl                 | Mikroliter                                       |
| µm                 | Mikrometer                                       |
| nm                 | Nanometer  |
| OD <sub>580</sub>  | optische Dichte bei 580 nm                       |
| OD <sub>660</sub>  | optische Dichte bei 660 nm                       |
| PAGE               | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                  |
| PCR                | Polymerase-Ketten-Reaktion                       |
| P <sub>fru</sub>   | Promotor des <i>R. capsulatus fru</i> -Operons   |
| P <sub>aphII</sub> | Promotor des Kanamycin-Resistenzgens             |
| P <sub>T7</sub>    | T7-Promotor                                      |
| PVDF               | Polyvinylidendifluorid                           |
| RCV                | <i>Rhodobacter</i> definiertes Minimalmedium     |
| RNA                | Ribonukleinsäure                                 |
| RNase              | Ribonuklease                                     |
| rpm                | „revolutions per minute“/ Umdrehungen pro Minute |
| SaDesA/ SadesA     | Enzym/ Gen der <i>S. aggregata</i> Desaturase A  |
| SyDesA/ SydesA     | Enzym/ Gen der <i>Synechocystis</i> Desaturase A |
| SyDesB/ SydesB     | Enzym/ Gen der <i>Synechocystis</i> Desaturase B |
| SyDesC/ SydesC     | Enzym/ Gen der <i>Synechocystis</i> Desaturase C |
| SyDesD/ SydesD     | Enzym/ Gen der <i>Synechocystis</i> Desaturase D |
| SDS                | Natriumdodecylsulfat                             |
| sec                | Sekunde(n)                                       |
| Sm                 | Streptomycin                                     |
| Spc                | Spectinomycin                                    |
| Tab.               | Tabelle  |
| TEMED              | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin               |
| T <sub>m</sub>     | Schmelztemperatur                                |
| Tris               | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                 |
| tRNA               | transport-RNA                                    |
| Tween              | Polyoxyethylensorbitolmonolaurat                 |
| V                  | Volt   |
| v/v                | Volumen pro Volumen                              |
| W                  | Watt   |
| WT                 | Wildtyp  |
| w/v                | Gewicht pro Volumen                              |
| YFP                | gelb fluoreszierendes Protein                    |

---

## I Einleitung

Fettsäuren und Phospholipide spielen als Ausgangsstoffe industrieller Anwendungen oder als Zusatzstoffe in Ernährungspräparaten und Pharmazeutika in der Bioindustrie eine wichtige Rolle. Das bedeutendste Einsatzgebiet von Fettsäure-Verbindungen sind Öle für die menschliche Ernährung (Drexler et al., 2003; Jaworski & Cahoon, 2003; Dyer et al., 2008). Dabei gelten insbesondere ungesättigte Fettsäuren als physiologisch und gesundheitlich wertvoll, da sie den Cholesterinspiegel senken und so das Risiko von Herzerkrankungen vermindern (Petrie et al., 2010; Simopoulos, 2008; White, 2009; Zevenbergen et al., 2009). Für höhere Organismen zählen mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu den essentiellen Nährstoffen, mit Bedeutung für die Regulation der Membranfluidität sowie als Vorstufen und Signalstoffe bei verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen des Körpers (Racine & Deckelbaum, 2007; Li & Hu, 2009; Maggio et al., 2009; Levitan et al., 2010; Birch et al., 2010). Säugetiere sind nicht in der Lage, mehrfach ungesättigte Fettsäuren selbst zu synthetisieren, können diese aber durch Umsetzung pflanzlicher Vorstufen (vorwiegend Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) herstellen (Nakamura & Nara, 2004; Harnack et al., 2009; Petrie et al., 2009). Ernährungspräparate mit essentiellen Fettsäuren wie Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure (Tab. I-1) oder deren Vorstufen können ebenfalls die Versorgung des Körpers mit diesen wichtigen Stoffen gewährleisten (Robert, 2006; Fetterman & Zdanowicz, 2009; White, 2009). So ist etwa konjugierte Linolsäure, eine Isoform der Linolsäure mit konjugierten Doppelbindungen (C18:2  $\Delta$ 9,11 oder C18:2  $\Delta$ 10,12) ein verbreitetes Ernährungspräparat (Cahoon et al., 2007; Racine et al., 2010; Reynolds & Roche, 2010).

Neben der Verwendung als Nahrungsmittel besitzen Phospholipide und Öle ein großes Potential für eine Reihe industrieller Anwendungen (Li et al., 2009; Taylor et al., 2009; Nilsson et al., 2010), etwa bei der Herstellung von industriellen Schmiermitteln, Isolierflüssigkeiten, Kunststoffen und Asphalt (Metzger & Bornscheuer, 2006; Erhan et al., 2008; Lu & Larock, 2009; Campanella et al., 2010; Napier & Graham, 2010) oder als Bestandteil in Wasch- und Reinigungsmitteln, Seifen und Kosmetika sowie in Farben und Lacken (Minol & Sinemus, 2004). Samenöle, die reich an Epoxy-Fettsäuren wie Vernolsäure (12-Epoxy-C18:1  $\Delta$ 9) sind, besitzen kommerziellen Wert als Grundlage von Weichmachern, Klebstoffen und Farben, sowie als Vorstufen von Nylon und Verbundstoffen (Jaworski & Cahoon, 2003; Li et al., 2010). Konjugierte Fettsäuren sind von industriellem Interesse als

Trocknungsmittel in Farben sowie für Kosmetika (Cahoon et al., 2001; Hornung et al., 2002; Cahoon et al., 2007).

Ein anderer Einsatzbereich für Fettsäuren und Lipide in der Industrie sind ökologische Alternativen zu Treibstoffen (Dyer et al., 2008; Glisic et al., 2009; Röttig et al., 2010) oder als Zusätze in Heizölen (Mushrush et al., 2006). So wird etwa Biodiesel durch die Reaktion pflanzlicher Öle oder tierischer Fette in der Gegenwart eines alkalischen Katalysators gewonnen (Lestari et al., 2009; Van Gerpen, 2009; Lam et al., 2010). Im Gegensatz zu herkömmlichen Verbrennungsstoffen sind sie CO<sub>2</sub>-, Stickstoff- und Schwefel-neutral (Fargione et al., 2008; Melillo et al., 2009; Bouwman et al., 2010) und emittieren weniger verschmutzende oder schädliche Gase als gewöhnliche Dieselmotorkraftstoffe (Hill et al., 2006; Durrett et al., 2008; Lin et al., 2008; Tsai et al., 2010).

Andere Fettsäuren sind von industriellem Interesse aufgrund ihrer hohen Reaktivität, durch die sie als Ausgangsstoffe für chemische Umsetzungen dienen können. Dazu zählen cyclische Fettsäuren, deren Ringstrukturen unter hoher Spannung stehen und aufgrund der daraus resultierenden hohen Reaktionsfähigkeit leicht für chemische Umsetzungen verwendet werden können (Bao et al., 2003; Serra et al., 2006) sowie ungesättigte Fettsäuren, deren Doppelbindungen die Einführung anderer funktioneller Gruppen in die Kohlenstoffkette begünstigen (Li et al., 2009).

Einer der Vorteile von Fettsäuren und Phospholipiden als Ressourcen besteht darin, dass es sich bei ihnen um nachwachsende Rohstoffe handelt. Während die Reserven herkömmlicher industrieller Rohstoffe wie Erdöl oder Kohle langsam zur Neige gehen, werden Fettsäuren und von ihnen abgeleitete Verbindungen aus erneuerbaren Quellen wie Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen gewonnen (Dyer & Mullen, 2008; Carlsson, 2009; Song et al., 2009; Röttig et al., 2010). Zudem verhalten sie sich im Gegensatz zu fossilen Rohstoffen CO<sub>2</sub>-neutral, so dass eine Verstärkung des Treibhauseffektes vermieden wird (Carlsson, 2009; Song et al., 2009; Rötting et al., 2010). Zusätzlich sind sie in den meisten Fällen besser biologisch abbaubar und tragen damit weniger zur weiteren Verschmutzung der Umwelt bei (Erhan et al., 2008; Lu & Larock, 2009; Song et al., 2009).

Die Verwendungsmöglichkeiten von Fettsäuren, Phospholipiden oder Ölen hängen in erster Linie von den biophysikalischen und chemischen Eigenschaften der betroffenen Fettsäuren ab. Die Eigenschaften individueller Fettsäuren wiederum werden durch die Struktur der Moleküle bestimmt, wie die Länge der Acylkette, die Anzahl und Position von Doppelbindungen oder die Präsenz anderer funktioneller Gruppen (Kinney, 1996; Durrett et al., 2008; Kochhar & Henry, 2009). Gegenwärtig wird der industrielle Wert von Fettsäuren

und Lipiden als industrielle Ressourcen durch die verfügbaren Fettsäure-Kompositionen eingeschränkt (Heppard et al., 1996; Hu et al., 2005; Dyer et al., 2008; Erhan et al., 2008). Natürliche Öle bestehen typischerweise aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 16 oder 18 Kohlenstoffatomen in ihrer Acylkette (Millar et al., 2000; Adamska et al., 2004; Damude & Kinney, 2008). Diese Gemische haben für industrielle Anwendungen nur geringe Bedeutung, da zum einen die enthaltenen Fettsäuren nicht zwangsläufig die für industrielle Prozesse notwendigen Eigenschaften besitzen, und zum anderen für viele industrielle Anwendungen hochreine Gemische mit 90 bis 95% der gewünschten Verbindung notwendig sind, damit die Nutzung im Vergleich mit herkömmlichen Produkten der Petrochemie wirtschaftlich ist (Durrett et al., 2008; Barra, 2009; Carlsson, 2009; Graef et al., 2009). Um Pflanzenöle für industrielle Anwendungen interessant zu machen, müssen sie in einer einzelnen Fettsäure angereichert werden, welche Doppelbindungen oder funktionelle Gruppen in spezifischen Positionen trägt (Dyer et al., 2008; Carlsson, 2009). Viele neuere Forschungen konzentrieren sich auf die Suche nach Biomasse, die das Potential für eine hohe Ausbeute ungewöhnlicher Fettsäuren bei geringen Kosten besitzt (Nordhoff et al., 2007; Carlsson, 2009; Henry, 2010).

## **1 Fettsäuren und Lipide**

Fettsäuren sind langkettige aliphatische Monocarbonsäuren. Sie können in einer Vielzahl von Strukturen auftreten, darunter verzweigte und unverzweigte Vertreter oder Derivate mit besonderen funktionellen Gruppen wie Doppelbindungen, Dreifachbindungen, Methylgruppen oder cyclischen Konfigurationen. Bestimmte Subklassen können Heteroatome wie Stickstoff, Schwefel oder Halogene enthalten. Das wichtigste Heteroatom ist Sauerstoff, welches meist in der Form von Epoxy- oder Hydroxylgruppen auftritt (Millar et al., 2000; Fahy et al., 2005).

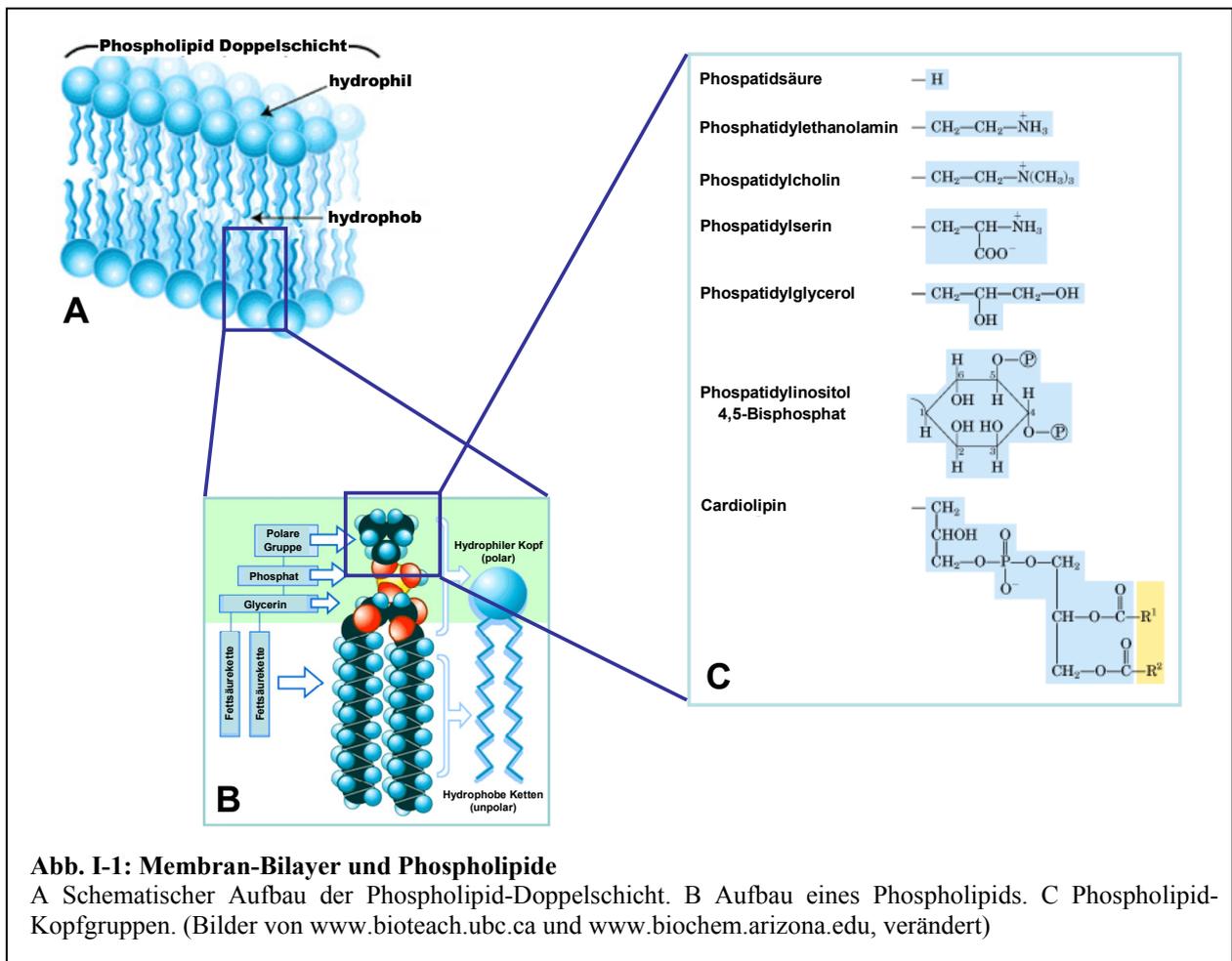
Natürlich vorkommende Fettsäuren besitzen meist geradzahlige Kohlenstoffketten mit acht bis 24 C-Atomen (Sijtsma & de Swaaf, 2004). Sie werden als gesättigte Verbindungen bezeichnet, wenn alle Kohlenstoffatome mit Wasserstoff abgesättigt sind, so dass die Acylkette keine Doppelbindungen enthält. Enthält eine Fettsäure dagegen Doppelbindungen in ihrer Acylkette, wird sie als ungesättigt bezeichnet. Eine Übersicht über eine Reihe wichtiger Fettsäuren zeigt Tab. I-1.

In dieser Arbeit wird für Fettsäuren eine Kurzschreibweise verwendet, die auf der Länge der Acylkette und der Anzahl und Position der Doppelbindungen basiert (Drexler et al., 2003). Die Länge der Kohlenstoffkette wird abgekürzt als C, gefolgt von der Zahl der Kohlenstoffatome in der Acylkette. Die Anzahl der Doppelbindungen wird mit einem Doppelpunkt dahinter gestellt. Die Position des ersten Kohlenstoffatoms einer Doppelbindung, vom Carboxy-Ende der Acylkette gezählt, wird als delta-Position ( $\Delta$ ) angegeben. Die Kurzschreibweise für Linolsäure, eine Fettsäure mit 18 C-Atomen und zwei Doppelbindungen an den Kohlenstoffatomen 9 und 12, lautet demzufolge C18:2  $\Delta$ 9,12.

In Zellen liegen Fettsäuren selten in der Form "freier" Fettsäuren vor, sondern werden mit einem Rückgrat aus Glycerol-3-Phosphat verestert. Wenn alle drei Positionen des Glycerols mit Fettsäuren verestert sind, resultiert ein Triacylglycerol. Diese Strukturen werden nur selten in Membranen angetroffen, bilden aber die wichtigste Form der Lipidspeicherung in Pflanzensamen (Ohlrogge & Browse, 1995; Sharma et al., 2008; Takeuchi & Reue, 2009). Glycerophospholipide dagegen tragen Fettsäuren in den sn-1 und sn-2 Positionen des Glycerol-Rückgrats und in der sn-3-Position eine polare Kopfgruppe (Zhang & Rock, 2008a). Der schematische Aufbau eines Phospholipids ist in Abb. I-1B gezeigt.

**Tab. I-1: Übersicht über wichtige Fettsäuren**

| Trivialname             | Chemischer Name                               | Chemische Formel                     | Kurzbezeichnung                |
|-------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------|
| Laurinsäure             | Dodecansäure                                  | C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> COOH | C12:0                          |
| Myristinsäure           | Tetradecansäure                               | C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> COOH | C14:0                          |
| Palmitinsäure           | Hexadecansäure                                | C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> COOH | C16:0                          |
| Stearinsäure            | Octadecansäure                                | C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> COOH | C18:0                          |
| Palmitoleinsäure        | <i>cis</i> -9-Hexadecaensäure                 | C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> COOH | C16:1 $\Delta$ 9               |
| Ölsäure                 | <i>cis</i> -9-Octadecaensäure                 | C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> COOH | C18:1 $\Delta$ 9               |
| <i>cis</i> -Vaccensäure | <i>cis</i> -11-Octadecaensäure                | C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> COOH | C18:1 $\Delta$ 11              |
| Linolsäure              | <i>cis</i> -9,12-Octadecaensäure              | C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> COOH | C18:2 $\Delta$ 9,12            |
| $\alpha$ -Linolensäure  | <i>cis</i> -9,12,15-Octadecaensäure           | C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> COOH | C18:3 $\Delta$ 9,12,15         |
| $\gamma$ -Linolensäure  | <i>cis</i> -6,9,12-Octadecaensäure            | C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> COOH | C18:3 $\Delta$ 6,9,12          |
| Eicosapentaensäure      | <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure   | C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> COOH | C20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17    |
| Docosahexaensäure       | <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure | C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> COOH | C22:6 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19 |



Anhand der Kopfgruppe werden Phospholipide in verschiedene Klassen eingeteilt (Zhang & Rock, 2008b). Einige Beispiele für Kopfgruppen zeigt Abb. I-1C. Die Hauptkomponente der meisten biologischen Membranen ist Phosphatidylglycerol (Antonopoulou et al., 2002; Hölzl & Dörmann, 2007; Wada & Murata, 2007; Zhang & Rock, 2008b). Durch die Kondensation von zwei Phosphatidylglycerin-Molekülen synthetisieren einige Organismen Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol), welches vier Acylgruppen und zwei negative Ladungen enthält (Zhang & Rock, 2008b; Romantsov et al., 2009). Phosphatidylcholin kommt in den Membranen von Eukaryonten (Veen & Lang, 2004) sowie in Cyanobakterien vor (Antonopoulou et al., 2002; Hölzl & Dörmann, 2007; Wada & Murata, 2007). In Bakterien ist es dagegen nur selten anzutreffen (Klug & Benning, 2001; Martínez-Morales et al., 2003; Sohlenkamp et al., 2003). Weitere Beispiele für Phospholipidklassen sind Phosphatidylethanolamin sowie das schwach saure Phosphatidylserin, welche vorwiegend in Eukaryonten auftreten, aber auch in vielen Prokaryonten enthalten sind (Zhang & Rock, 2008b).

Die Kombination der nicht-polaren Fettsäure-Acylketten und der polaren Kopfgruppen führt zu den amphipathischen Eigenschaften von Phospholipiden. Aufgrund dieser Struktur lagern Phospholipide sich in wässriger Umgebung zu Strukturen zusammen, in denen die apolaren, hydrophoben Molekülbestandteile (Fettsäurereste) durch die polaren, hydrophilen Teile (Kopfgruppen) gegen das umgebende Wasser abgeschirmt werden. In den Membranen von Zellen bilden sich dabei zweischichtige, flexible Membranen („Bilayer“, Abb. I-1A), in welche die Membranproteine eingebettet sind (Zhang & Rock, 2008a). Die Membran dient als Schutz gegen die Umgebung der Zellen und bildet eine undurchdringliche Barriere für ionische und polare Substanzen.

Die physikalischen Eigenschaften von Glycerophospholipiden hängen vorwiegend vom Grad der Desaturierung der Fettsäuren ab, die mit dem Glycerol-Rückgrat der Lipide verestert sind. Auch andere funktionelle Gruppen wie Verzweigungen oder cyclische Elemente üben einen Einfluss aus (Zhang & Rock, 2008a). Davon betroffen ist insbesondere die Membranfluidität. Gesättigte Fettsäuren besitzen eine gerade Struktur und können sich effizient aneinanderlagern, um einen stabilen Layer mit geringer Permeabilität zu erzeugen. Die Desaturierung in der *cis*-Konfiguration führt einen Knick in die Acylkette ein, durch den die Ordnung des Bilayers gestört wird. Das führt zu höherer Beweglichkeit der Phospholipide und somit zu erhöhter Fluidität der Membran. Verzweigte Acylketten unterbrechen die Bilayer-Packung durch die Unregelmäßigkeiten aufgrund der Verzweigungen (Zhang & Rock, 2008a). Die Fluidität in der Membran bestimmt unter anderem die Durchlässigkeit der Bilayerschicht, Interaktionen zwischen Membranproteinen und die Aktivität von ATPasen und Carrier-vermitteltem Transport. Änderungen im Desaturierungsgrad der lipidgebundenen Fettsäure-Moleküle können daher die Funktionen membrangebundener Enzyme beeinflussen (Lewis & McElhaney, 2005; Bruno et al., 2007; Mansilla et al., 2008; Lundbaek et al., 2010). Bei bestimmten Umgebungsfaktoren, wie Temperaturveränderungen oder Osmolarität oder pH des Mediums passen Bakterien die Fettsäurenkomposition ihrer Membran an und erhalten so den für Lebensprozesse notwendigen Grad der Membranfluidität aufrecht (Mansilla et al., 2008; Zhang & Rock, 2008a; Shivaji & Prakash, 2010). Auch in Pflanzen sichern diese Systeme bei niedrigen Temperaturen wichtige Funktionen wie Wachstum, Entwicklung, Photosynthese und Signaltransduktion (Wallis & Browse, 2002; Falcone et al., 2004; Upchurch, 2008). Die größte Bedeutung besitzt die Umsetzung gesättigter Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren durch Desaturierung (Kap. I-1.3.1). Einige Bakterien besitzen zudem spezialisierte Isomerasen, durch die sie als Reaktion auf steigende Temperaturen oder in die Membran interkalierende und diese so destabilisierende Moleküle *cis*-ungesättigte Fettsäuren

in *trans*-ungesättigte Fettsäuren umwandeln können (Sardesai & Bhosle, 2002; Fischer et al., 2010).

### **1.1 Biologische Quellen für Fettsäuren und Lipide**

Fettsäuren und ihre Derivate gehören zu den verbreitetsten natürlichen Produkten. Heutzutage sind weit über 300 verschiedene Fettsäuren bekannt (Dyer et al., 2008).

Die wenigsten industriell bedeutsamen Fettsäuren lassen sich durch chemische Synthese erzeugen. Insbesondere die Einführung von Doppelbindungen oder speziellen funktionellen Gruppen ist mit den herkömmlichen Methoden der chemischen Synthese nicht möglich (Langer et al., 2006) oder führt zu einer Mischung verschiedener Derivate (Li et al., 2009). Wertvolle Lipidverbindungen werden daher meist aus natürlichen Quellen gewonnen. So enthalten etwa Fischöle hohe Mengen an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und gelten daher als wichtig für eine gesunde Ernährung (Racine & Deckelbaum, 2007; Fetterman & Zdanowicz, 2009; Li & Hu, 2009; Plaza et al., 2009; Levitan et al., 2010).

Die heutzutage bedeutendste Methode zur Produktion prozesstechnisch interessanter Fettsäuren und Lipide ist die Nutzung der Syntheseleistung von Ölpflanzen wie Soja, Oliven, Sonnenblumen oder Raps. Diese Pflanzen akkumulieren Fettsäuren als energiereiche Speicherverbindungen, etwa als ölhaltige Samen (Damude & Kinney, 2008). Dabei können Lipide bis zu 80% der Trockenmasse dieser Saaten ausmachen und enthalten oft hohe Anteile ungesättigter Fettsäuren (Sijtsma & de Swaaf, 2004; Damude & Kinney, 2008; Sharma et al., 2008). Im Gegensatz zu der sehr einheitlichen Komposition von Membranlipiden, können aus Ölsaaten gewonnene Fettsäuren eine hohe Vielfalt in Bezug auf die Kettenlänge der Acylketten, die Ausstattung mit besonderen funktionellen Gruppen oder den Grad der Desaturierung aufweisen (Voelker & Kinney, 2001). Allerdings sind gerade ungewöhnliche Fettsäuren in Pflanzenölen nur in bestimmten Spezies vertreten, die zur Gewinnung ihrer Produkte oft auf teuren Wegen importiert werden müssen. So ist zum Beispiel Kokos- oder Palmöl für viele industrielle Prozesse von Nutzen, weil sie große Anteile kurz- und mittelkettiger Fettsäuren enthalten (Minol & Sinemus, 2004). Ein weiterer Nachteil von Pflanzen als Öllieferanten besteht darin, dass die konzentrierten Öle nur einen Teil der Biomasse ausmachen, und somit nur ein Teil der Energie, die in den Aufbau der Biomasse fließt, für die Produktion der Lipidverbindungen verwendet wird.

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um die industriellen Eigenschaften von Ölen aus bestehenden Anbaupflanzen zu verbessern (Jaworski & Cahoon, 2003; Durrett et al., 2008; Napier & Graham, 2010). Gentechnologische Methoden erlauben heute die Konstruktion von Designerpflanzen mit erhöhter Ölproduktion, Resistenzen gegen Schädlinge und Krankheiten und verbesserter Ölqualität (Singh et al., 2005; Wu et al., 2005; Damude & Kinney, 2008; Sharma et al., 2008). So konnten zum Beispiel Rapspflanzen (*Brassica napus*) mit einem erhöhten Anteil Laurinsäure (Wiberg et al., 1997) oder ohne die gesundheitsschädliche Erucasäure im Öl erzeugt werden (Peng et al., 2010). Von Soja existiert eine Variante, die aufgrund eines erhöhten Ölsäure- und erniedrigten Palmitinsäuregehaltes für die Produktion von Biotreibstoff besonders geeignet ist (Graef et al., 2009). Bei der Sonnenblume kennt man Mutanten, deren Öl einzelne Fettsäuren in erhöhten Anteilen von bis zu 90% enthalten kann (Skorić et al., 2008). Weitere Anstrengungen betreffen die Identifikation und transgene Expression von Genen, die für Enzyme kodieren welche in den Syntheseprozessen besonderer Fettsäuren beteiligt sind (Jaworski & Cahoon, 2003), etwa zur Entwicklung von Landpflanzen mit hohen Anteilen langkettiger, ungesättigter Fettsäuren wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure im Öl (Singh et al., 2005; Damude & Kinney, 2008; Hoffmann et al., 2008; Petrie et al., 2009; Venegas-Calación, 2010).

Die Erzeugung transgener Pflanzen ist allerdings aufgrund der schwer zugänglichen Genetik und der langen Generationszeit ein schwieriger Prozess. Viele Versuche zur Erzeugung transgener Pflanzen zur Produktion industriell interessanter Öle und Fettsäuren führten nur zu niedrigen Ausbeuten (Singh et al., 2005; Cahoon et al., 2007; Dyer & Mullen, 2008). Zudem werden die Zulassung und Nutzung transgener Pflanzen sowie die Vermarktung von Produkten gentechnisch veränderter Pflanzen durch Gentechnikgesetze eingeschränkt.

Eine Alternative zur Gewinnung von Ölen und Fettsäuren aus Pflanzen oder Tieren stellt die Nutzung prokaryotischer Organismen als Produzenten dieser Verbindungen dar (Kalscheuer et al., 2006; Langer et al., 2006; Stöveken & Steinbüchel, 2008). Einige Mikroorganismen, insbesondere marine Algen und Pilze, enthalten bereits große Mengen wichtiger ungewöhnlicher Fettsäuren wie langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Bergé & Barnathan, 2005; Rittmann, 2008; Petrie et al., 2009; Petrie et al., 2010; Sakuradani et al., 2009).

Die Lipidzusammensetzung in Bakterien ist meist bedeutend einfacher als in höheren Organismen: Mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Sterole kommen nahezu ausschließlich in höheren Organismen und Cyanobakterien vor, und nur wenige Bakterien synthetisieren

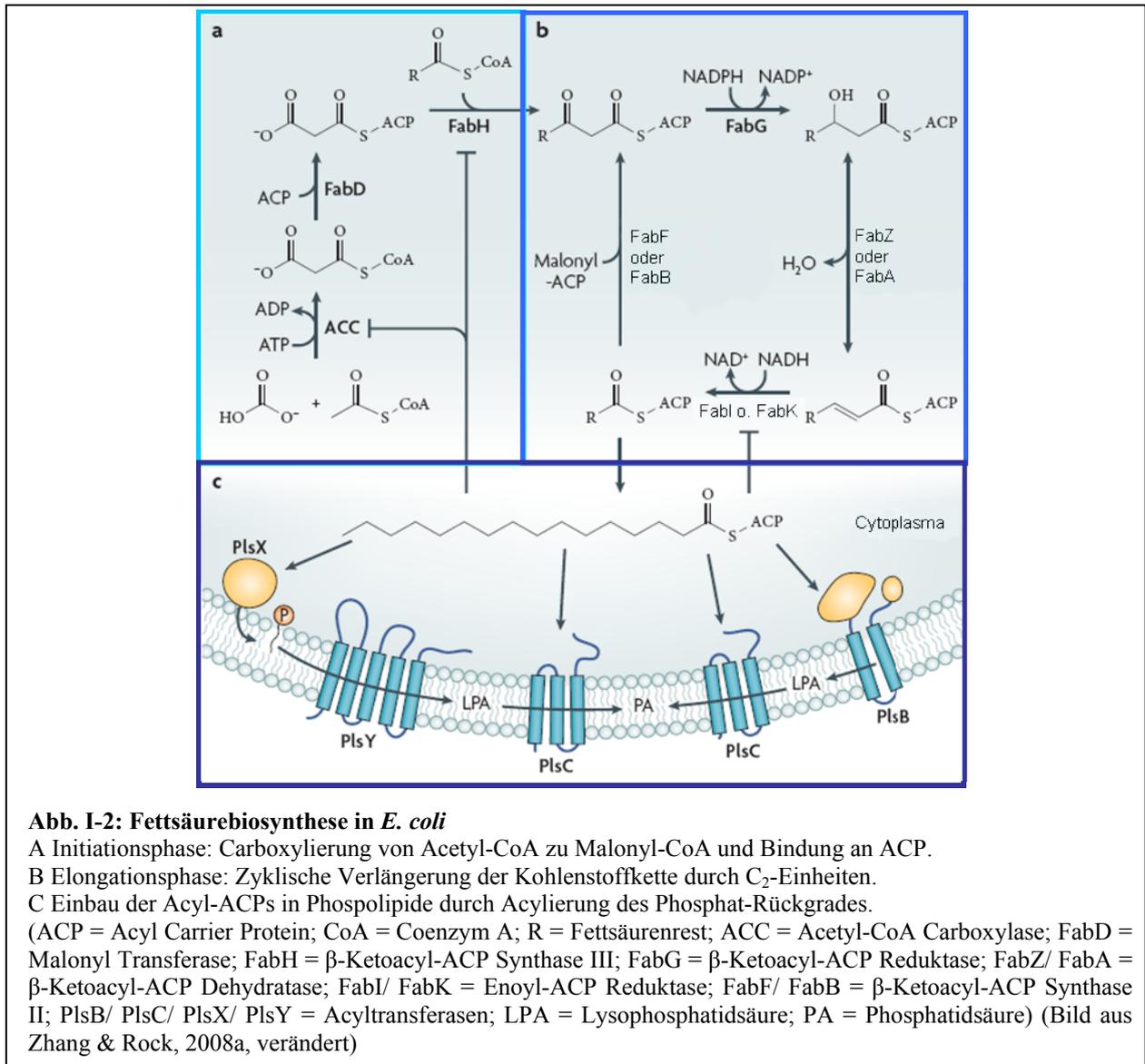
Verbindungen wie Phosphatidylcholin und Triglyceride (Klug & Benning, 2001; Alvarez & Steinbüchel, 2002; Sohlenkamp et al., 2003; Nakamura & Nara, 2004; Conde-Alvarez et al., 2006; Wältermann et al., 2007). Dies bietet eine Grundlage zur Produktion hochreiner Fettsäuremischungen. Aufgrund ihrer gut verstandenen Genetik und kurzer Generationszeiten ist die Manipulation von Mikroorganismen für die optimierte Produktion spezieller Fettsäuren und Phospholipide im Vergleich zu höheren Organismen einfacher (Rittmann, 2008). Heterologe Gene für Enzyme, die an diesen Prozessen beteiligt sind, können mit vergleichsweise geringem Aufwand in die Organismen eingebracht werden. Zudem machen Fettsäuren und Phospholipide einen hohen Anteil der Biomasse von Bakterien aus, was die Energiebilanz und den Platzbedarf der Produktion günstiger macht (Rittmann, 2008).

## 1.2 Bakterielle Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden

Bakterien verwenden zur Fettsäuresynthese den so genannten Typ II Fettsäure-Biosyntheseweg (FAS II, Abb. I-2), der in *E. coli* detailliert charakterisiert wurde (Schujman & de Mendoza, 2005; Zhang & Rock, 2008a). Die genetische Basis dieses Syntheseweges ist ein Set hochkonservierter Gene, von denen jedes einen einzelnen Schritt der Synthese kodiert (White et al., 2005; Zhang & Rock, 2008a). Alle beteiligten Proteine sind im Cytosol lokalisiert.

Ein zentrales Element des FAS II Syntheseweges ist das Acyl Carrier Protein (ACP), welches alle Zwischenstufen des Syntheseweges zu den beteiligten Enzymen transportiert (Byers & Gong, 2007; Zhang & Rock, 2008a). ACP ist ein Protein geringer molekularer Masse (ca. 8,8 kDa) und besitzt vier  $\alpha$ -Helix-Strukturen, die eine hydrophobe Bindetasche bilden, sowie 4'-Phosphopantethein als prosthetische Gruppe. Fettsäure-Acylketten werden in der Bindetasche untergebracht und kovalent an die prosthetische Gruppe gebunden. Interaktionen zwischen ACP und den an der Fettsäure-Biosynthese beteiligten Enzymen erfolgen zwischen einer konservierten elektronegativen und hydrophoben Struktur der zweiten Helix und einer korrespondierenden Bindeoberfläche nahe des aktiven Zentrums des betroffenen FAS II Enzyms (White et al., 2005).

Der FAS II Syntheseweg wird in drei distinkte Phasen unterteilt: Initiationsphase, Elongationsphase und die anschließende Veresterung mit Glycerol-3-Phosphat zu Phospholipiden.



In der Initiationsphase (Abb. I-2A) wird Acetyl-CoA durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA umgewandelt (Zhang & Rock, 2008a). Dieses Enzym besteht aus vier separaten Proteinen und benötigt Biotin als kovalent gebundenen Cofaktor. Dann wird die Malonyl-Gruppe durch die Malonyl-Transacylase FabD auf ACP übertragen. FabH, ein kondensierendes Enzym welches die Bildung der neuen Acylkette beginnt, übernimmt Acyl-CoA und kondensiert dieses mit Malonyl-CoA, um das erste  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Intermediat des FAS II-Synthesewegs zu formen.

In der Elongationsphase (Abb. I-2B) zirkuliert die wachsende Acylkette zwischen vier Enzymen, wobei bei jedem Kreislauf die Acylkette um zwei Kohlenstoffatome verlängert wird. Die erste Reaktion ist die Reduktion von  $\beta$ -Ketoacyl-ACP – welches entweder aus der Initiationsphase stammt oder aus vorangehenden Runden der Elongation – zu  $\beta$ -Hydroxyacyl-

ACP durch die  $\beta$ -Ketoreduktase FabG. Der nächste Schritt ist die Dehydrierung des  $\beta$ -Hydroxyacyl-ACPs durch das universell in Bakterien vorkommende Enzym FabZ. Eine Isoform von FabZ, FabA, spielt eine Rolle in der *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren. Die Enoyl-ACP-Reduktase FabI vollendet den Zyklus der Elongation. Die nächste Runde wird durch die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase FabF initiiert, welche eine weitere  $C_2$ -Einheit in Form von Malonyl-CoA an die wachsende Acylkette anfügt. Eine Isoform von FabF, FabB, übernimmt diese Aufgabe bei der *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren. Bakterien, welche über die Enzyme FabA und FabB verfügen, sind in der Lage Doppelbindungen in wachsende Acylketten einzubringen, um *cis*-ungesättigte Fettsäuren zu erzeugen (Edwards et al., 1997; White et al., 2005). FabA ist eine Dehydratase, welche im  $C_{10}$ -Stadium  $\beta$ -Hydroxy-ACP zu *trans*-2-Decenoyl-ACP umwandelt. Es wirkt zudem als Isomerase, welche ein Gleichgewicht zwischen *trans*-2 und *cis*-3-Decenoyl-ACP erzeugt, die als Vorstufen der Doppelbindung dienen. *Cis*-3-Decenoyl-ACP wird anschließend spezifisch durch FabB verlängert, nicht durch FabF.

Es ist möglich, die *de novo* Synthese ungesättigter Fettsäuren durch das Antibiotikum Cerulenin zu unterdrücken. Dieses Antibiotikum bildet eine kovalente Verbindung mit einem Cystein am aktiven Zentrum von FabB. Dabei ragt die  $C_{12}$ -Acylkette des Cerulenin in die hydrophobe Bindetasche des Enzyms hinein, in welchem normalerweise während der Fettsäure-Biosynthese die wachsende Acylkette untergebracht ist, und inhibitiert so kompetitiv die Bindung des natürlichen Substrats an das Enzym (Rock & Jackowski, 2002; Zhang et al., 2006a).

Das Endprodukt des Elongationszyklus sind langkettige Acyl-ACP, welche von einem Set von Acyltransferasen angenommen werden, um Glycerol-3-Phosphat zu acylieren und so die Fettsäuren in Membranphospholipide einzubauen (Abb. I-2C). Das verbreitetste System dazu ist der PlsX-PlsY Weg (Hara et al., 2008). PlsX, ein peripheres Membranprotein, transferiert die Acyl-Gruppe von dem langkettigen Acyl-ACP auf ein anorganisches Phosphat, um ein reaktives Acylphosphat-Intermediat zu bilden. Diese aktivierte Fettsäure wird dann durch PlsY, ein integrales Membranprotein, verwendet um die Position 1 von Glycerol-3-P zu acylieren. Das Produkt, Lysophosphatsäure, wird durch das integrale Membranprotein PlsC weiter acyliert. Diesem Kernmolekül wird schließlich eine polare Kopfgruppe zugefügt, um ein Phospholipid zu bilden.

Die Fettsäurenkomposition in der Membran wird von der Gesamtaktivität aller an ihrer Biosynthese beteiligten Enzyme bestimmt und unterliegt fein abgestimmten Regulationsmechanismen (Feng & Cronan, 2009; Zhu et al., 2009). Dies erlaubt es den

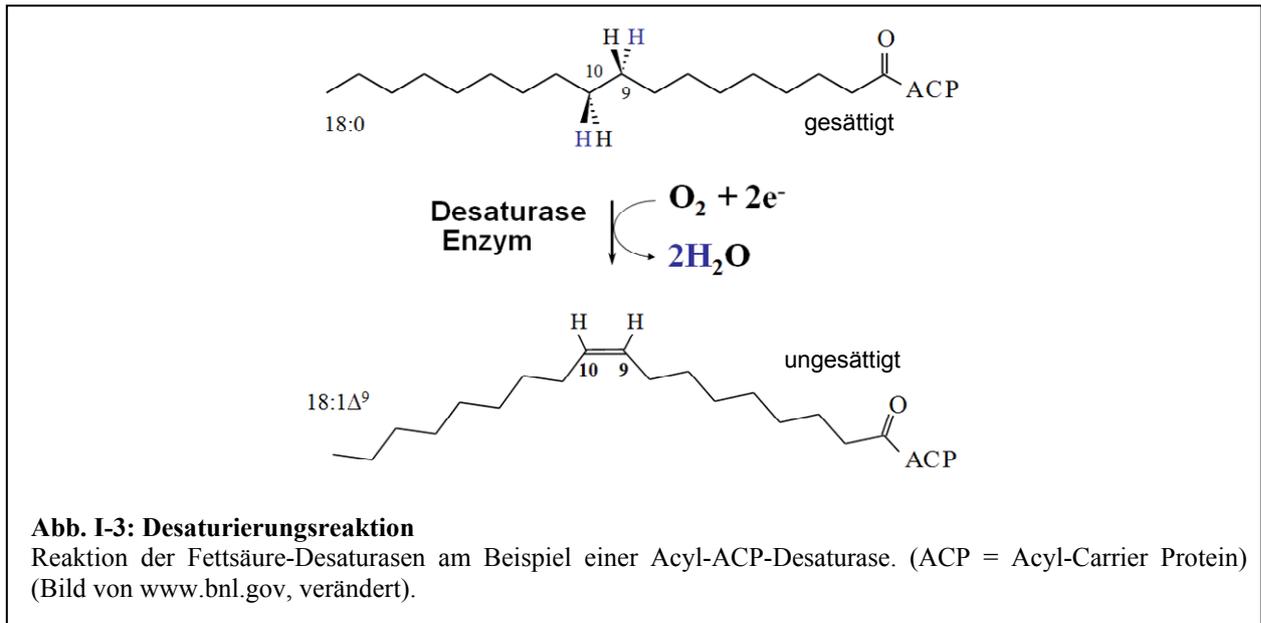
Zellen, bereits auf der Ebene der Fettsäuren-Biosynthese die Membranzusammensetzung an Umweltfaktoren wie etwa Temperaturschwankungen anzupassen (Zhang & Rock, 2008a; Mansilla et al., 2008; Zhang & Rock, 2009). Zudem verfügen lebende Zellen über Mechanismen, durch welche bereits bestehende Fettsäuren modifiziert werden können.

### 1.3 Fettsäuremodifizierende Enzyme

Einige Organismen verfügen über die Fähigkeit, Acylketten bereits bestehender Fettsäuren enzymatisch zu modifizieren (Shanklin & Cahoon, 1998; Wallis & Browse, 2010). Bis heute konnte eine Vielzahl von Genen für Fettsäuren-modifizierende Enzyme aus diversen Pro- und Eukaryonten isoliert werden, die dazu genutzt werden können ungewöhnliche Fettsäuren und Phospholipide zu erzeugen (Voelker & Kinney, 2001; Jaworski & Cahoon, 2003). Dabei umfasst die Gruppe der Fettsäure-modifizierenden Enzyme sehr unterschiedliche Enzymgruppen, etwa Desaturasen (Aguilar & de Mendoza, 2006; Harwood & Guschina, 2009), Hydroxylasen (Meesapyodsuk & Qiu, 2008), Epoxygenasen, Monooxygenasen (Dresen et al., 2010), Elongasen (Harwood & Guschina, 2009) und Isomerasen (Buist, 2007). Von besonderer Bedeutung für die Industrie, insbesondere für die Produktion von Polymeren, sind Fettsäuren, die Epoxy- oder Hydroxylgruppen enthalten (Meesapyodsuk & Qiu, 2008; Hou, 2009). Vernolsäure (12-Epoxyoctadeca-*cis*-9-Säure) trägt eine Epoxygruppe durch die Insertion eines Sauerstoffatoms an der  $\Delta$ 12-Doppelbindung von phospholipidgebundener Linolsäure durch eine spezialisierte Epoxygenase (Cahoon et al., 2002). Aus *Ricinus communis* konnte ein Gen für eine  $\Delta$ 12-Hydroxylase isoliert werden, welche die Doppelbindung am zwölften Kohlenstoffatom der Ölsäure in eine Hydroxylgruppe umwandelt und so die Ricinolsäure (12-OH C18:1  $\Delta$ 9) erzeugt (Palaskar et al., 2010).

Zu den komplexeren Vorgängen zählt die Konversion in der Membran vorhandener *cis*-ungesättigter Fettsäuren zu cyclischen Fettsäuren (Iwig et al., 2004; Shabala & Ross, 2008; Zhang & Rock, 2008a). Dabei wird die *cis*-Doppelbindung einer ungesättigten Fettsäure methyliert, um eine Cyclopropan-Gruppe zu erzeugen.

Die größte funktionelle Diversität unter den Fettsäure-modifizierenden Enzymen wurde bislang in der Gruppe der Fettsäure-Desaturasen beobachtet (Jaworski & Cahoon, 2003; Warude et al., 2006; Mansilla et al., 2008).



### 1.3.1 Fettsäure-Desaturasen

Fettsäure-Desaturasen katalysieren die Einführung von Doppelbindungen in die Kohlenstoffkette bestehender Fettsäuren und setzen so gesättigte Fettsäuren in ungesättigte um (Abb. I-3; Aguilar & de Mendoza, 2006; Gagné et al., 2009). Durch aufeinander folgende Desaturierungsschritte verschiedener Fettsäure-Desaturasen können mehrfach ungesättigte Fettsäuren erzeugt werden (Nakamura & Nara, 2004). Die typische Reaktion pflanzlicher und cyanobakterieller Desaturasen etwa besteht in der Desaturierung von Stearinsäure in der Position  $\Delta 9$  zur Ölsäure, welche dann durch weitere Desaturierung an der Position  $\Delta 12$  zur Linolsäure umgesetzt wird. Linolsäure kann dann entweder durch Desaturierung in der Position  $\Delta 15$  zu  $\alpha$ -Linolensäure umgesetzt werden, oder zu  $\gamma$ -Linolensäure durch Desaturierung in der Position  $\Delta 6$  (Watanabe et al., 2004). In Tieren und Menschen können mit Linolsäure oder Linolensäure als Vorstufen ungesättigte Fettsäuren mit fünf und mehr Doppelbindungen erzeugt werden (Napier & Michaelson, 2001; Nakamura & Nara, 2004; Calder & Yaqoob, 2009).

Bei der Reaktion der Desaturierung von Fettsäuren wird eine Doppelbindung in eine Acylkette eingeführt, indem Wasserstoffatome von benachbarten Kohlenstoffen der Enzymkette abgespalten und auf ein aktiviertes Sauerstoff-Intermediat übertragen werden, welches auf diese Weise zu Wasser reduziert wird (Behrouzian & Buist, 2003; Aguilar & de Mendoza, 2006). Daher ist die Reaktion aller bislang bekannten Fettsäure-Desaturasen ein sauerstoffabhängiger Prozess (Shanklin & Cahoon, 1998; Aguilar & de Mendoza, 2006). Da

die C-H-Bindung von Methylengruppen in Fettsäuren eine der stabilsten bekannten Bindungen in lebenden Systemen darstellt, ist der Prozess der Entfernung eines Wasserstoffatoms aus einer Methylengruppe einer Acylkette höchst energieaufwändig. Die Reaktion erfordert NAD(P)H sowie einen metallischen Cofaktor als Elektronendonator (Los & Murata, 1998; Behrouzian & Buist, 2003; Kurdrid et al., 2007). Beispiele für Desaturase-spezifische Elektronendonoren sind Cytochrom b5 (Napier et al., 2003; Petrini et al., 2004; Warude et al., 2006; Gostincar et al., 2010) und Ferredoxin (Shanklin & Cahoon, 1998; Sayanova et al., 2006).

Fettsäure-Desaturasen dienen in lebenden Organismen vor allem dem Zweck, die Überlebensfähigkeit in kalter Umgebung zu erhöhen (Los & Murata, 1998; Aguilar & de Mendoza, 2006; Mansilla et al., 2008). Im Allgemeinen führen reduzierte Wachstumstemperaturen zu einem höheren Anteil ungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden, um bei niedrigen Temperaturen eine ausreichende Membranfluidität zu gewährleisten (Nakamura & Nara, 2004; Lewis & McElhaney, 2005; Aguilar & de Mendoza, 2006; Mansilla et al., 2008).

Neben dieser typischen Aktivität katalysieren einige Fettsäure-Desaturasen andere Reaktionen, darunter die Bildung von *trans*-Doppelbindungen (Dyer et al., 2002; Cahoon & Kinney, 2004; Gao et al., 2009), konjugierten Doppelbindungen (Hornung et al., 2002; Serra et al., 2006) oder Dreifachbindungen (Sperling et al., 2000; Gagné et al., 2009), sowie die Einführung spezieller funktioneller Gruppen wie Hydroxylgruppen (Broadwater et al., 2002; Cahoon & Kinney, 2004) oder Epoxygruppen in die Acylkette (Cahoon et al., 2001; Voelker & Kinney, 2001).

Die wichtigsten Quellen von Fettsäure-Desaturasen sind Pflanzen (Cahoon & Kinney, 2004; Hernandez et al., 2005; Hu et al., 2005; Kim et al., 2006; Dyer & Mullen, 2008), marine Algen (Suga et al., 2002; Petrie et al., 2009; Petrie et al., 2010) und Cyanobakterien (Sakamoto et al., 1994; Panpoom et al., 1997; Apiradee et al., 2004; Chi et al., 2008), die oft mehrere verschiedene Desaturasen enthalten. Allerdings ist die Enzymgruppe der Desaturasen über alle Organismenreiche hinweg konserviert (Nakamura & Nara, 2004; Aguilar & de Mendoza, 2006), so dass auch in Bakterien (Bonamore et al., 2006; Zhu et al., 2006), Pilzen (Passorn et al., 1999; Watanabe et al., 2004; Kainou et al., 2006; Oh & Martin, 2006; Sakuradani et al., 2009; Huang et al., 2010; Watanabe et al., 2010) und Tieren einschließlich Menschen (Napier & Michaelson, 2001; Nakamura & Nara, 2004; Petrini et al., 2004; Serra et al., 2006) Fettsäure-Desaturasen gefunden werden können.

Man unterscheidet drei Arten von Fettsäure-Desaturasen. Acyl-CoA Desaturasen fügen Doppelbindungen in Fettsäuren ein, die an Coenzym A gebunden sind – diese Enzyme findet man hauptsächlich in Eukaryonten (Gostincar et al., 2010), vor allem in marinen Algen (Petrie et al., 2009; Petrie et al., 2010). Acyl-ACP-Desaturasen dagegen fügen Doppelbindungen in Fettsäuren ein, die an das Acyl-Carrier-Protein gebunden sind und sind ausschließlich im Stroma von Pflanzen zu finden (Sakamoto et al., 1994; Whitney et al., 2004). Die Enzyme aus diesen beiden Gruppen liegen löslich im Cytoplasma vor und sind durch ein konserviertes Bindungsmotiv aus Histidinen gekennzeichnet (Shanklin & Cahoon, 1998; Sayanova et al., 2006). Die Enzyme der dritten Gruppe, die Acyl-Lipid-Desaturasen, fügen Doppelbindungen in Fettsäuren ein, die mit Glycerolipiden verestert sind (Cybulski et al., 2002; Chintalapati et al., 2006). Diese Desaturasen stellen die größte Gruppe dar und sind in Pflanzen, Cyanobakterien und Bakterien zu finden. Sie sind stets membrangebunden und besitzen ein ebenfalls aus Histidinboxen bestehendes Konsensus-Motiv, welches als koordinierendes Zentrum für Cofaktoren mit zwei Eisenatomen dient (Los & Murata, 1998; Shanklin & Cahoon, 1998; Sayanova et al., 2006).

Fettsäure-Desaturasen zeigen gewöhnlich eine hohe Spezifität in Bezug auf die Kettenlänge und bereits existierende Doppelbindungen oder funktionelle Gruppen ihres Substrates (Shanklin & Cahoon, 1998) sowie für die Position im Phospholipid, in der die Fettsäure verestert ist (Chintalapati et al., 2006). Zusätzlich ist die Position, in welcher die Doppelbindung in die Acylkette eingefügt wird, meist für jede Fettsäure-Desaturase spezifisch (Voelker & Kinney, 2001; Meesapyodsuk et al., 2007; Zhang et al., 2009).

Es gibt allerdings auch Ausnahmen. So konnte aus den Pilzen *Fusarium moniliforme* und *Magnaporthe grisea* eine bifunktionelle Desaturase isoliert werden, welche das Substrat Ölsäure sowohl in den Positionen  $\Delta 12$  als auch  $\Delta 15$  desaturiert (Damude et al., 2006), während eine Desaturase aus *Punica granatum* in Ölsäure Doppelbindungen in den Positionen  $\Delta 11$  (*trans*) und  $\Delta 14$  (*cis*) einzufügen vermag um so Punicinsäure (C18:2  $\Delta 9,11,14$ ) zu erzeugen (Hornung et al., 2002). Aus dem Moos *Ceratodon purpureus* konnte eine bifunktionelle Desaturase isoliert werden, welche Doppel- oder Dreifachbindungen in die  $\Delta 6$ -Position von  $\alpha$ -Linolensäure einfügt (Carlsson et al., 2004; Sperling et al., 2000). Ebenso existieren einige Fettsäure-Desaturasen mit weniger strikter Substratspezifität, etwa eine Desaturase aus *Trypanosoma brucei*, welche eine  $\Delta 12$ -Doppelbindung in spezifischem Abstand zu einer bereits existierenden Doppelbindung verschiedener Substrate einfügt (Petrini et al., 2004). *Bacillus subtilis* verfügt über eine Desaturase, welche sich durch eine ungewöhnliche Desaturierungsposition ( $\Delta 5$ ) sowie durch eine niedrige Substratspezifität

auszeichnet (Cybulski et al., 2002; Diaz et al., 2002; Mansilla & de Mendoza, 2005; Bonamore et al., 2006). Eine weitere  $\Delta 5$ -Desaturase wurde in dem marinen Pilz *Thraustochytrium* sp. FJN-10 entdeckt (Huang et al., 2010). Die Motten-Spezies *Trichoplusia ni* und *Spodoptera littoralis* verfügen über Desaturasen, die eine  $\Delta 11$ -Desaturierung katalysieren (Serra et al., 2006). Eine Desaturase, die auf Fettsäuren in der sn-2-Position von Phospholipiden anstelle der typischen sn-1-Position wirkt wurde in Cyanobakterien entdeckt (Chintalapati et al., 2006).

#### **1.4 Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium**

Neben der *de novo* Biosynthese verfügen Mikroorganismen über eine weitere Quelle für die zum Aufbau ihrer Membranen notwendigen Fettsäuren: die Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium.

Der Transport von Fettsäuren über Membranen kann in drei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden: die Integration der Fettsäure in die Membran, die Translokation über den Bilayer, sowie die Extraktion aus der Membran (Black & DiRusso, 2003). Die Bindung exogener Fettsäuren an die Membran ist ein schneller Prozess, der von der Anzahl der Fettsäurebindenden Stellen in der Membran auf beiden Seiten des Bilayers abhängt, und durch spezielle Bindeproteine gefördert wird. Der Transport auf die andere Seite des Bilayers basiert auf einem Flip-Flop-Mechanismus. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs beträgt dabei Millisekunden bis Sekunden beträgt abhängig von der Ladung der Fettsäure, der Kettenlänge und des biophysikalischen Zustands der Membran (Hamilton, 1998; Black & DiRusso, 2003; Kamp & Hamilton, 2006; Brunaldi et al., 2007). Während dieser Prozess für nicht geladene Fettsäuren keine Proteine zur Hilfestellung erfordert, sind an der Translokation von anionischen Fettsäuren Transportproteine beteiligt (Hamilton, 1998; Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003). Die Extraktion der Fettsäuren am inneren Monolayer ist ebenfalls ein proteinabhängiger Prozess, der von den Erfordernissen des Stoffwechsels gesteuert wird und bedeutend langsamer abläuft als der Prozess der Membran-Translokation (Hamilton, 1998).

Zusätzlich verfügen Bakterien über Transportsysteme aus ATP-abhängigen Proteinen. In *E. coli* spielen dabei vor allem das Protein FadL in der äußeren Membran sowie die mit der inneren Membran assoziierte Fettsäure-Coenzym A-Synthetase eine wichtige Rolle (Azizan et al., 1999; Schaffer, 2002; Schmelter et al., 2004; Hamilton, 2007; Hearn et al., 2009), die den Transport von  $C_{12}$  bis  $C_{18}$  Fettsäuren katalysieren.

## 2 Die heterologe Genexpression

Die Natur bietet eine Fülle von Genen für Enzyme und Proteine mit potentiellm Nutzen für industrielle Anwendungen. Die Nutzung dieser Genprodukte in den Ursprungsorganismen ist allerdings meist nicht effektiv möglich, da sie in diesen häufig nur in geringen Konzentrationen vorliegen und die ursprünglichen Wirte oft für Kultivierung in großem Maßstab nicht geeignet sind.

In solchen Fällen bedient man sich der heterologen Genexpression, um einzelne Gene unabhängig vom Ursprungsorganismus in anderen Organismen zur Erzeugung von Genprodukten mit relevanten Funktionen in großen Mengen zu nutzen. Die Zielgene werden dabei in Expressionsvektoren kloniert und in einfach zu handhabenden Organismen exprimiert. Beispiele für Organismen, die schon lange als Expressionswirte für heterologe Gene dienen, umfassen Bakterien wie *E. coli* (Jana & Deb, 2005; Sørensen & Mortensen, 2005; Peti & Page, 2007) oder *B. subtilis* (Li et al., 2004; Schallmey et al., 2004; Westers et al., 2004; Zweers et al., 2008), aber auch eukaryotische Organismen, etwa Hefen wie *S. cerevisiae* und *Pichia pastoris* (Daly & Hearn, 2006; Maya et al., 2008; Cregg et al., 2009), Grünalgen (León-Bañares et al., 2004; Rosenberg et al., 2008) sowie Zellkulturen von Pflanzen (Boehm, 2007; Weathers et al., 2010) und Tieren (Altmann et al., 1999; Schmidt, 2004). Mikroorganismen zählen dabei zu den am häufigsten genutzten Expressionssystemen, da diese sich mit Hilfe einer Vielzahl genetischer Werkzeuge leicht manipulieren lassen und ihre kurzen Generationszeiten und die einfache und kostengünstige Kultivierung eine ökonomische Produktion großer Mengen des rekombinanten Genproduktes erlauben (Zerbs et al., 2009).

### 2.1 Potentielle Probleme bei der heterologen Expression in Mikroorganismen

Obwohl bereits eine Vielzahl von heterologen Proteinen erfolgreich in Mikroorganismen exprimiert werden konnten, erweist sich dies nicht immer als effiziente Strategie. Unterschiede in der genetischen und physiologischen Basis des Ursprungsorganismus und des heterologen Expressionswirtes können zu geringen Proteinausbeuten oder inaktiven oder instabilen Enzymen führen.

Ein Problem kann auftreten, wenn der Ursprungsorganismus und der Expressionswirt eine unterschiedliche Codon-Usage verwenden, das heißt verschiedene alternative Codons

bevorzugen, um eine bestimmte Aminosäure zu kodieren (Gutman & Hatfield, 1989; Carbone et al., 2003; Gilchrist et al., 2009). Das bedeutet, dass die tRNA-Moleküle für bevorzugte Codons in größerer Menge in den Zellen vorliegen als tRNA-Moleküle für selten verwendete Codons. Dies kann bei heterologer Expression dazu führen, dass Gene, die ein seltenes Codon enthalten, mit geringerer Effizienz exprimiert werden, weil der Vorrat der kognitiven tRNAs für dieses Codon rasch verbraucht wird (Zahn, 1996; Gustafsson et al., 2004; Angov et al., 2008). Unter Umständen kann dieser Effekt zu weiteren Problemen führen wie Leserasterverschiebungen (McNulty et al., 2003), translationale „Sprünge“ (Kane et al., 1992) oder den Einbau falscher Aminosäuren (Calderone et al., 1996; Forman et al., 1998; McNulty et al., 2003). In einigen Fällen konnte das Problem ungünstiger Codon-Usage dadurch vermieden werden, dass Gene, die für die kognitiven tRNAs der seltenen Codons kodieren, koexprimiert werden (Forman et al., 1998; McNulty et al., 2003; Sørensen et al., 2003; Kim & Lee, 2006). Eine andere Möglichkeit besteht darin, seltene Codons des Zielgens durch gezielte Mutationen in andere Codons zu überführen, die für die gleiche Aminosäure kodieren, aber von dem Expressionswirt häufiger verwendet werden (Chang et al., 2006; Angov et al., 2008; Welch et al., 2009). Diese Codon-Optimierung ist allerdings ein sehr zeit- und kostenaufwändiger Prozess.

Ein anderes Problem bei der heterologen Expression stellen toxische Proteine dar, die zu einer verringerten Proteinausbeute aufgrund von hohem Stress für die Zellen führen kann (Saïda, 2007). Zur Expression solcher Proteine ist es wichtig, die heterologen Gene unter die Kontrolle strikt regulierter induzierbarer Promotoren zu stellen. Auf diese Weise ist es möglich, erst mit der Expression zu beginnen, wenn die Wirtszellen ausreichend Biomasse gebildet haben um eine effiziente Ausbeute zu gewährleisten (Rossi & Blau, 1998; Wycuff & Matthews, 2000; Jonasson et al., 2002; Weber & Fussenegger, 2007).

Selbst bei Proteinen, die an sich nicht toxisch sind, kann man mitunter ähnliche Effekte beobachten, wenn der durch die heterologe Expression ausgelöste metabolische Stress für die Zellen zu groß wird (Dong et al., 1995; Andersson et al., 1996; Hoffmann & Rinas, 2004). Diese Effekte werden vermutlich durch die hohen Anforderungen in Bezug auf die Energie und Ressourcen ausgelöst, die die Überexpression von Proteinen an die Zellen stellt (Glick, 1995; Corchero & Villaverde, 1998; Hoffmann & Rinas, 2004). Zusätzlich kann die Expression heterologer Gene im Organismus eine Stress-Antwort auslösen. So werden bei der Expression heterologer Gene manchmal Hitzeschock-Gene und Gene für DNA-Reparatur hochreguliert (Gill et al., 2000; Lesley et al., 2002; Xu & Link, 2009).

Eine gut bekannte Stressantwort besteht in einer Verstärkung der proteolytische Aktivität der Zellen, indem die Expression wirtseigener Proteasen vermehrt induziert wird (Harcum & Bentley, 1999; Ramírez & Bentley, 1999). Diese Enzyme bauen vorhandene Proteine ab und wirken damit der effizienten Akkumulation rekombinanten Proteins entgegen (Jensen et al., 2000). Es existieren eine Reihe bekannter Proteasen, von denen analoge Formen in diversen Mikroorganismen bekannt sind. Die Protease ClpXP ist eine Zweikomponenten-Protease bestehend aus den Untereinheiten ClpX und ClpP und besitzt neben der Proteaseaktivität zusätzlich eine Chaperon-Aktivität (Suzuki et al., 1997; Banecki et al., 2001; Tomoyasu et al., 2001; Zolkiewski, 2006). Diese Protease ist in der Lage, ohne Energiezufuhr eine Vielzahl kleiner Proteine zu spalten, sowie ATP-abhängig große Proteine (Wawrzynow et al., 1996; Kim et al., 2000; Ades, 2004). Auch die Protease HslUV besteht aus zwei Untereinheiten, HslU und HslV (Lien et al., 2009). Sie wird vor allem als Bestandteil der Antwort auf einen Hitzeschock exprimiert und ist nur unter ATP-Verbrauch proteolytisch aktiv (Kwon et al., 2004; Burton et al., 2005; Yakamavich et al., 2008). Eine weitere in vielen Organismengruppen wie Bakterien, Hefen, Pflanzen und Menschen verbreitete Protease ist die Lon-Protease (Fu & Markovitz, 1998; Bretz et al., 2002; Chandu & Nandi, 2004; Jackson et al., 2004). Auch dabei handelt es sich um eine ATP-abhängige Protease. In *E. coli* baut sie mehr als die Hälfte der ATP-abhängig zu degradierenden Proteine ab (Maurizi, 1992; Laskowska et al., 1996). Die Aktivität der Protease Lon wird durch die sequenzspezifische Bindung an DNA eingeleitet (Fu et al., 1997).

Der proteolytische Abbau von rekombinanten Proteinen bei der heterologen Expression von Proteinen konnte in einigen Fällen durch die Fusion mit stabilisierenden Partnerproteinen (Martinez et al., 1995; Corchero et al., 1996; Skosyrev et al., 2003) oder die Koexpression stabilisierender Faktoren (LeThanh et al., 2005) vermieden oder abgemildert werden. In den meisten Fällen verwendet man zu diesem Zweck allerdings spezielle Mutanten der Expressionswirte, in denen eine oder mehrere Proteasen ausgeschaltet wurden (Nishihara et al., 1998; Chen et al., 2004; Sørensen et al., 2005; Idiris et al., 2006; Maehara et al., 2008).

Ein weiteres häufig zu beobachtendes Problem bei der heterologen Expression ist die Bildung von unlöslichen Aggregaten des heterologen Proteins, so genannten „inclusion bodies“ (Rinas & Bailey, 1993; Villaverde & Carrió, 2003; Fahnert et al., 2004; Rinas et al., 2007). Diese Ablagerung kann durch Expressionsbedingungen und Expressionslevel (Strandberg & Enfors, 1991) sowie durch strukturelle Eigenschaften des rekombinanten Proteins (Murby et al., 1995) ausgelöst werden. Auch eine falsche Faltung des heterologen Proteins kann eine Anreicherung in „inclusion bodies“ bewirken (Wall & Plückthun, 1995; Baneyx & Mujacic,

2004; Sabate et al., 2010). Die Aggregation heterologer Proteine in „inclusion bodies“ kann vermieden werden, indem schwächere Promotoren oder eine geringere Konzentration des Induktors verwendet werden (Georgiou & Valax, 1996; Wycuff & Matthews, 2000), die Expressionsbedingungen optimiert werden (Strandberg & Enfors, 1991; Georgiou & Valax, 1996; Mansell et al., 2008) oder das heterologe Protein mit einem leicht löslichen Partnerprotein fusioniert wird (LaVallie & McCoy, 1995). Auch eine Verbesserung der Faltungseigenschaften des Proteins kann Abhilfe schaffen, zum Beispiel durch die Koexpression molekularer Chaperone (Vasseur-Godbillon et al., 2006; Rinas et al., 2007; Mansell et al., 2008; Kolaj et al., 2009).

Einige heterologe Proteine erfordern für ihre effiziente und aktive Expression zusätzliche Komponenten, die nicht in allen Expressionswirten synthetisiert werden. Manche Membranproteine erfordern etwa die Gegenwart spezifischer assoziierter Lipide (Opekarová & Tanner, 2003), andere Proteine benötigen Kofaktoren oder prosthetische Gruppen, um aktiviert zu werden (Leonard et al., 2008; Schewe et al., 2008). In einigen Fällen konnten diese Kofaktoren oder andere Komponenten durch Koexpression zur Verfügung gestellt werden (Weickert et al., 1996; Leonard et al., 2008; Schewe & Kaup, 2008).

Leider führen diese Lösungsstrategien für Probleme bei der heterologen Expression nicht immer zum Ziel oder sind mit hohem Aufwand verbunden, insbesondere wenn eine Reihe von Faktoren optimiert werden müssen. In diesen Fällen wird oft auf alternative Expressionswirte ausgewichen, die etwa eine effiziente Faltungsmaschinerie, eine günstigere Codon-Verwendung oder andere vorteilhafte Eigenschaften aufweisen. Ein Beispiel für einen alternativen bakteriellen Expressionswirt ist das phototrophe Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*.

### **3 Das phototrophe Bakterium *R. capsulatus***

*R. capsulatus* ist ein  $\alpha$ -Proteobakterium aus der Gruppe der phototrophen nicht-Schwefel Purpurbakterien. Es zählt zur Familie der Rhodospirillaceae. Diese Gram-negativen, stäbchenförmigen Bakterien leben vor allem in den lichtdurchdrungenen Schichten stehender oder langsam fließender Süßgewässer, können aber auch in anderen Habitaten vorkommen, etwa auf landwirtschaftlichen Nutzflächen wie Reisfeldern, in Abwässern aus der fischverarbeitenden Industrie oder in Kläranlagen (Weaver et al., 1975). Kennzeichnende Eigenschaften von *R. capsulatus* sind die rote Färbung durch die photosynthetischen

Pigmente, sowie eine Umhüllung durch eine Polysaccharidkapsel. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen bildet dieses Bakterium ein spezialisiertes System aus Membrantubuli und –vesikeln aus, welches als intracytoplasmatische Membran (ICM) bezeichnet wird und den größten Teil der photosynthetischen Apparate beherbergt (Drews, 1996). Die wichtigsten Membranlipide in *R. capsulatus* sind Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Cardiolipin und Phosphatidylcholin (Arondel et al., 1993; Klug & Benning, 2001; Kim et al., 2007). Diese Bakterien verfügen zudem über einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran von bis zu 90% (Campbell & Lueking, 1983).

Das Genom von *R. capsulatus* umfasst 3,5 Mb mit einem GC-Gehalt von ungefähr 68%. Es wurde vollständig sequenziert (Strnad et al., 2010). Die annotierten Sequenzdaten stehen in der ERGO-Light Datenbank zur freien Verfügung ([www.ergo-light.com](http://www.ergo-light.com)).

*R. capsulatus* ist in der Lage, mehrere unterschiedliche Stoffwechselwege zur Bereitstellung von Energie und Zellbausteinen zu nutzen. Dieses Bakterium kann zur Energiegewinnung sowohl aerobe und anaerobe Respiration (Zannoni, 1995; McCrindle et al., 2005) als auch anoxygene Photosynthese nutzen (Gregor & Klug, 1999; Bauer et al., 2003). Bei dem Prozess der anoxygenen Photosynthese wird zur Synthese von ATP Lichtenergie in einen Protonengradienten umgewandelt, ohne dass dabei Sauerstoff entsteht. Diese Art der Energiegewinnung wird von *R. capsulatus* ausschließlich unter anaeroben Bedingungen im Licht verwendet. Im Dunkeln und unter aeroben Bedingungen verwendet dieses Bakterium die aerobe Respiration zur Energiegewinnung. *R. capsulatus* ist des Weiteren durch zwei unterschiedliche Nitrogenase-Komplexe in der Lage, atmosphärischen Stickstoff als N-Quelle zu nutzen (Masepohl et al., 2002; Drepper et al., 2003). Auch dieser Prozess ist eng an die anaerobe Photosynthese gekoppelt (Joshi & Tabita, 1996; Elsen et al., 2004). Weitere StoffwechsellLeistungen in *R. capsulatus* sind der Wasserstoff-Metabolismus (Vignais et al., 2000) und die CO<sub>2</sub>-Fixierung (Tabita, 1995).

### **3.1 Vorteile von *R. capsulatus* für die heterologe Expression**

Im Vergleich zu anderen Expressionswirten weist *R. capsulatus* mehrere metabolische und morphologische Besonderheiten auf, durch welche dieses Bakterium als Wirt zur heterologen Expression Fettsäure-modifizierender Enzyme wie Fettsäure-Desaturasen in Frage kommt.

So führt die Ausbildung der intracytoplasmatischen Membran unter phototrophen Wachstumsbedingungen (Kap. I-3) zu einer bedeutenden Vergrößerung der

Membranoberfläche. Diese Eigenschaft, die normalerweise der effizienten Unterbringung der membranständigen Photosynthesekomplexe dient, bedeutet möglicherweise einen Vorteil zur effektiven Überexpression von integralen Membranproteinen. Diese können effizient und mit einem geringeren Risiko für toxische Effekte für die Zellen in die Membran eingelagert werden, wie in dem Bakterium *R. sphaeroides* anhand einiger Membrantransporter gezeigt wurde (Laible et al., 2004; Kucz, 2005; Roy et al., 2008).

Die Befähigung von *R. capsulatus* zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen kann von Vorteil für die Expression heterologer Proteine sein, die unter aeroben Bedingungen toxisch auf die Zellen wirken.

*R. capsulatus* synthetisiert unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine Reihe von Kofaktoren, prosthetischen Gruppen und Elektronendonoren, die in *E. coli* nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorliegen, darunter Häm-Gruppen (Lang et al. 1996; de Smet et al., 2001; Smart et al., 2004), Pterin-Molybdän-Kofaktoren (Moco; Wang et al., 1993; Solomon et al., 1999; Schumann et al., 2008; Wiethaus et al., 2009), FAD (Nogués et al., 2005) und Eisen-Schwefel-Cluster (Jeong & Jouanneau, 2000; Chevallet et al., 2003; Sainz et al., 2006; Nomata et al., 2008), sowie den Elektronendonator Ferredoxin (Nogués et al., 2005; Sainz et al., 2006; Bortolotti et al., 2009). Auch diese Eigenschaft ist möglicherweise ein Vorteil bei der Expression von Enzymen, deren Aktivität von diesen Kofaktoren abhängt.

Einige besondere Eigenschaften von *R. capsulatus* machen dieses Bakterium potentiell zu einem interessanten Expressionswirt für heterologe Fettsäure-Desaturasen.

So handelt es sich bei vielen Enzymen dieser Gruppe um membranständige Enzyme, die in der intracytoplasmatischen Membran in großen Mengen eingebaut werden könnten. Zudem stellt die erhöhte Lipidmenge in *R. capsulatus* Zellen, die eine intracytoplasmatische Membran ausgebildet haben, auch das Substrat von heterolog exprimierten membranständigen Fettsäure-modifizierenden Enzymen, phospholipidgebundene Fettsäuren, in größerer Menge zur Verfügung.

Auch die Möglichkeit, *R. capsulatus* unter anaeroben Wachstumsbedingungen anzuziehen, kann für die Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen ein Vorteil sein. Diese Enzyme erhöhen den Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran und können damit einen erheblichen Einfluss auf die Fluidität der Zellmembran ausüben (Kap. I-1). Da es sich bei der Membranfluidität um eine wichtige biophysikalische Eigenschaft der Membran handelt, die auf eine Vielzahl von Membranfunktionen zurückwirken kann, ist dieser Effekt potentiell toxisch für die Zellen. Die Reaktion der Desaturasen kann allerdings nur bei Sauerstoffzufuhr

stattfinden (Kap. I-1.3.1), daher sollten die heterolog exprimierte Enzyme die Zellen nicht beeinträchtigen, solange dem System kein Sauerstoff hinzugefügt wird.

Des Weiteren ist eine Reihe von Fettsäure-Desaturasen von metallischen Elektronendonoren wie Ferredoxin abhängig, um in aktiver Form exprimiert zu werden (Kap. I-1.3.1).

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Lipopolysaccharide (LPS) auf der Zelloberfläche von *R. capsulatus* nicht pyrogen sind. Das ist eine Bakterienreich ungewöhnliche Eigenschaft, die *R. capsulatus* einen Vorteil bei der Produktion von Pharmazeutika oder Ernährungszusätzen verschafft, einem wichtigen Verwendungsbereich für ungewöhnliche Fettsäuren (Loppnow et al., 1990).

## 4 Expressionssysteme

Um ein Protein effizient heterolog zu exprimieren, muss neben einem geeigneten Expressionswirt auch ein leistungsstarkes Expressionssystem gewählt werden. Es existieren heute eine Vielzahl von Expressionssystemen, basierend auf unterschiedlichen Promotoren und Wirtsorganismen.

Grundsätzlich kann zwischen stetig aktiven, so genannten konstitutiv exprimierenden Expressionssystemen, und induzierbaren Systemen unterschieden werden. Ein Beispiel für einen konstitutiv exprimierenden Promotor ist der Promotor des Kanamycin-Resistenzgens,  $P_{aphII}$ . Bei konstitutiver Expression existieren allerdings keine Regulationsmöglichkeiten, um zum Beispiel toxische Effekte bei der heterologen Proteinexpression zu vermeiden (Kap. I-2.1). Daher werden für die heterologe Expression induzierbare Promotoren bevorzugt, bei denen die Expression durch bestimmte Metaboliten im Medium oder das Anlegen bestimmter Wachstumsbedingungen begonnen werden kann. So ist es möglich, Wachstums- und Expressionsphase zu trennen.

Das heutzutage verbreitetste Expressionssystem ist das *E. coli* T7-Expressionssystem (Tabor & Richardson, 1985; Studier & Moffatt, 1986; Terpe, 2006).

### 4.1 T7-abhängige Expression

Bei den so genannten T7-Expressionssystemen stehen die rekombinanten Zielgene unter der transkriptionellen Kontrolle von Promotoren aus dem Bakteriophagen T7 (Tabor &

Richardson, 1985; Studier & Moffatt, 1986). Diese Promotoren umfassen 23 Basenpaare und werden ausschließlich von der spezifischen RNA-Polymerase desselben Phagens erkannt. Dieses Enzym besteht aus einer einzelnen Untereinheit und benötigt keine zusätzlichen Proteinfaktoren (Kochetkov et al., 1998; Durniak et al., 2008). Der Transkriptionsprozess der T7-RNA-Polymerase ist sehr schnell und führt daher zu einer sehr effizienten Akkumulation des heterologen Proteins (Studier & Moffatt, 1986). Die wirtseigene RNA-Polymerase erkennt die T7-Promotoren dagegen nicht und hat daher keinerlei Einfluss auf Gene, die unter dieser Kontrolle stehen. Umgekehrt erkennt die T7-RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht. Das ermöglicht die Koexpression mehrerer aufeinander folgender Gene (Studier & Moffatt, 1986; Drepper et al., 2005).

T7-Expressionssysteme bestehen aus zwei Komponenten, dem T7-Promotor ( $P_{T7}$ ) unter dessen Kontrolle das Zielgen steht, sowie der T7-RNA-Polymerase. T7-Expressionsplasmide basieren meist auf so genannten pET-Plasmiden (Rosenberg et al., 1987; Sørensen & Mortensen, 2005; Katzke et al., 2010). Die T7-RNA-Polymerase wird als induzierbares Gen in den heterologen Expressionswirt eingebracht (Davanloo et al., 1984). Dieses Gen ist entweder auf einem zweiten Plasmid lokalisiert oder wird in das Genom eingefügt, um spezialisierte T7-Expressionsstämme zu erzeugen.

In *E. coli* zählt das T7-Expressionssystem heute zu den am häufigsten eingesetzten Expressionssystemen (Terpe, 2006). Meist wird dazu der Stamm BL21(DE3) verwendet (Studier & Moffatt, 1986). Dieser trägt in seinem Genom eine chromosomale Kopie des lysogenen Lambda Prophagen DE3, der die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *E. coli* Promotors *lacUV5* exprimiert. Zusätzlich existieren auch in anderen Bakterien T7-Expressionssysteme, darunter *Pseudomonas aeruginosa* (Brunschwig & Darzins, 1992; Schweizer et al., 2001), *Pseudomonas putida* (Herrero et al., 1993), *Salmonella enterica* (McKinney et al., 2002; Santiago-Machuca et al., 2002), *Ralstonia eutropha* (Barnard et al., 2004), *Burkholderia glumae* (Beselin, 2005), *B. subtilis* (Conrad et al., 1996) und *Streptomyces lividans* (Lussier et al., 2010).

## 5 Ziele der Arbeit

Ungewöhnliche Fettsäuren und Phospholipide sind für ein breites Spektrum von Anwendungsbereichen von Bedeutung. Die typische Quelle von spezialisierten Lipidprodukten stellen Ölpflanzen dar, deren Eignung für die Produktion ungewöhnlicher

Fettsäuren und Phospholipide allerdings durch die schwer zugängliche Genetik und langsame Wachstumsraten eingeschränkt ist. Eine Alternative stellen mikrobielle Expressionswirte dar, die leichter zu handhaben und genetisch leichter zu manipulieren sind. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* (1) für die heterologe Expression von Proteinen und (2) für die Produktion spezialisierter Fettsäuren und Lipide geeignet ist.

Dazu sollten mehrere Fettsäure-Desaturasen vergleichend in *E. coli* und *R. capsulatus* exprimiert werden. Es sollte untersucht werden, ob sich die ausgewählten Fettsäure-Desaturasen in *E. coli* und *R. capsulatus* exprimieren lassen und welche Faktoren die optimale Ausbeute dieser heterologen Enzyme beeinflussen.

Zur Expression sollte das T7-Expressionssystem des Stamms *R. capsulatus* B10S-T7 verwendet werden. Dazu sollten zunächst durch heterologe Expression des Reporterproteins YFP die Expressionseigenschaften des Stammes näher charakterisiert werden im Hinblick auf (1) Expressionsstärke, (2) Induktion, (3) graduelle Regulation des Expressionslevels und (4) die Optimierung des Stammes durch Mutationen in Proteasegenen.

Eine wichtige Grundlage für die Umsetzung von Fettsäuren durch Fettsäure-Desaturasen ist die Bereitstellung der spezifischen Substrate. Da das Fettsäure-Spektrum von *R. capsulatus* begrenzt ist, sollten wirtsfremde Fettsäuren durch Aufnahme aus dem Kulturmedium in die Membran eingebracht werden. Dabei sollte untersucht werden, ob *R. capsulatus* B10S-T7 generell in der Lage ist, wirtsfremde Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufzunehmen und in seine Membran zu integrieren. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob es sich die Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren durch die Erhöhung der Löslichkeit der Fettsäuren im Medium oder durch die Inhibierung der wirtseigenen Biosynthese ungesättigter Fettsäuren steigern lässt.

## II Material und Methoden

### 1 Bakterienstämme

Tab. II-1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

| Organismus                              | Stamm  | Relevante Eigenschaften   | Referenz                |
|---|--|---|-------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>                 | BL21(DE3)  | F' <i>ompT hsdSb</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)  | Studier & Moffatt, 1986 |
|   | C43(DE3)   | Mutante von BL21(DE3) mit einer unbekanntem Mutation und fehlendem Plasmid.   | Miroux & Walker, 1996   |
|   | DH5 $\alpha$   | F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , [ $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , ( <i>res</i> <sup>-</sup> , <i>mod</i> <sup>+</sup> ), <i>deoR</i> | Hanahan, 1983           |
|   | S17-1  | Ec294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)], <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>  | Simon et al., 1983      |
| <i>Rhodobacter capsulatus</i>           | B10S   | Spontane Sm <sup>R</sup> -Mutante von <i>R. capsulatus</i> B10 (Wildtyp)  | Klipp et al., 1988      |
|   | B10S-T7  | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>recA</i> ::(P <sub>fru</sub> >T7Pol Gm <sup>R</sup> )  | Katzke, 2006            |
|   | B10S- $\Delta$ <i>lon</i> <sub>a</sub>                               | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>lon</i> ::Km <sup>R</sup> , Ori I  | Kreuz, 2003             |
|   | B10S- $\Delta$ <i>lon</i> <sub>p</sub>                               | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>lon</i> ::Km <sup>R</sup> , Ori II   | Kreuz, 2003             |
|   | B10S- $\Delta$ <i>hslV</i> <sub>a</sub>                              | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>hslV</i> ::Gm <sup>R</sup> , Ori I   | Kreuz, 2003             |
|   | B10S- $\Delta$ <i>hslV</i> <sub>p</sub>                              | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>hslV</i> ::Gm <sup>R</sup> , Ori II  | Kreuz, 2003             |
|   | B10S- $\Delta$ <i>clpP</i> <sub>a</sub>                              | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>clpP</i> ::Km <sup>R</sup> , Ori I   | Kreuz, 2003             |
| B10S- $\Delta$ <i>clpP</i> <sub>p</sub> | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>clpP</i> ::Km <sup>R</sup> , Ori II | Kreuz, 2003   |                         |
| <i>Bacillus subtilis</i>                | 168  | <i>trpC2</i>  | Kunst et al., 1997      |
| <i>Stappia aggregata</i>                |  | Wildtyp   | Weber & King, 2007      |
| <i>Arthrospira platensis</i>            | PCC9438  | Wildtyp   | Rippka, 1988            |
| <i>Synechocystis</i>                    | PCC6803  | Wildtyp   | Stanier et al., 1971    |

## 2 Plasmide

Tab. II-2: Verwendete Plasmide

| Rekombinante Plasmide                 | Relevante Eigenschaften   | Referenz/ Herkunft  |
|---------------------------------------|---|---------------------|
| pRhokHi-2                             | pBBR1-MCS Derivat, Polylinker aus pET22b, Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>       | Katzke et al., 2010 |
| pRhotHi-2                             | pBBR1-MCS Derivat, Polylinker aus pET22b, <Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>      | Katzke et al., 2010 |
| pRhokHi-6                             | pRhokHi-2-Derivat, Cm <sup>R</sup> ::Spc <sup>R</sup>                             | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-6                             | pRhotHi-2-Derivat, Cm <sup>R</sup> ::Spc <sup>R</sup>                             | Diese Arbeit        |
| pRhokHi-2- <i>yfp</i>                 | RhokHi-2-Derivat, <i>yfp</i>  | Heck, 2005          |
| pRhotHi-2- <i>yfp</i>                 | RhotHi-2-Derivat, <i>yfp</i>  | Heck, 2005          |
| pRhokHi-6- <i>yfp</i>                 | RhotHi-6-Derivat, <i>yfp</i>  | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>yfp</i> -H <sub>6</sub> | RhotHi-2-Derivat, <i>yfp</i> , His <sub>6</sub> -Tag                              | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>BsdesA</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Bacillus subtilis desA</i>                                   | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>SadesA</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Stappia aggregata desA</i>                                   | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>ApdesC</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Arthrospira platensis desC</i>                               | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>ApdesD</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Arthrospira platensis desD</i>                               | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>SydesA</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Synechocystis desA</i>                                       | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>SydesB</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Synechocystis desB</i>                                       | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>SydesC</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Synechocystis desC</i>                                       | Diese Arbeit        |
| pRhotHi-2- <i>SydesD</i>              | RhotHi-2-Derivat, <i>Synechocystis desD</i>                                       | Diese Arbeit        |
| pRhokHi-2- <i>SadesA</i>              | RhokHi-2-Derivat, <i>Stappia aggregata desA</i>                                   | Diese Arbeit        |
| pRhokHi-6- <i>SadesA</i>              | pRhokHi-6-Derivat, <i>Stappia aggregata desA</i>                                  | Diese Arbeit        |
| pAK7                                  | pUC19-Derivat mit internem 1.051 bp <i>lon</i> ::Km <sup>R</sup> -Fragment, OriI  | Kreuz, 2003         |
| pAK12                                 | pIC20H-Derivat mit 964 bp- <i>hslV</i> ::Gm <sup>R</sup> -Fragment, OriI          | Kreuz, 2003         |
| pAK13                                 | pIC20H-Derivat mit 964 bp- <i>hslV</i> ::Gm <sup>R</sup> -Fragment, OriII         | Kreuz, 2003         |
| pAK14                                 | pUC19-Derivat mit 1.796 bp- <i>clpP</i> ::Gm <sup>R</sup> -Fragment, OriI         | Kreuz, 2003         |
| pAK15                                 | pUC19-Derivat mit 1.796 bp- <i>clpP</i> ::Gm <sup>R</sup> -Fragment, OriII        | Kreuz, 2003         |
| pAK16                                 | pUC19-Derivat mit internem 1.051 bp <i>lon</i> ::Km <sup>R</sup> -Fragment, OriII | Kreuz, 2003         |

### 3 Oligonukleotide

Die verwendeten Startermoleküle (Primer) wurden von MWG Biotech AG bezogen. Durch den Primer in das PCR-Produkt eingefügte Schnittstellen wurden durch Unterstreichung gekennzeichnet (durchgezogene Linie: *Nde*I, punktierte Linie: *Xho*I).

Tab. II-3: Verwendete Primer

| Name                  | Sequenz (5' → 3')  | T <sub>m</sub><br>(°C) | Länge<br>(bp) | Verwendung  |
|-----------------------|--|------------------------|---------------|---|
| BsDesA <sub>up</sub>  | GGG AAT <u>TCA</u> TAT GAC TGA<br>ACA AAC CAT TGC ACA        | 65.8                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>BsdesA</i> |
| BsDesA <sub>low</sub> | CAG <u>CTC</u> <u>GAG</u> GGC ATT CTT<br>CCG CAG CTT CTG TTT | 72.0                   | 33            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>BsdesA</i> |
| SaDes <sub>up</sub>   | GGG AAT <u>TCA</u> TAT GGA ACT<br>GGC GAT CAC GGC GGT        | 72.0                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SadesA</i> |
| SaDes <sub>low</sub>  | CCG <u>CTC</u> <u>GAG</u> AGC AAG TTC<br>ACG CGT CTC TCT GAA | 73.2                   | 33            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SadesA</i> |
| ApDesC <sub>up</sub>  | GAG AAT <u>TCA</u> TAT GAC GAT<br>TGC AAC TGA AAC CAA        | 64.5                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>ApdesC</i> |
| ApDesC <sub>low</sub> | CCG <u>CTC</u> <u>GAG</u> GTT TTC CAC<br>CAA TTT AAC TTT TTT | 65.8                   | 33            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>ApdesC</i> |
| ApDesD <sub>up</sub>  | GGG AAT <u>TCA</u> TAT GAC ATC<br>AAC AAC GTC AAA AGT        | 64.5                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>ApdesD</i> |
| ApDesD <sub>low</sub> | CCG <u>CTC</u> <u>GAG</u> AAC AGT TAA<br>CTG CTC GAT CGC TTT | 70.7                   | 33            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>ApdesD</i> |
| SyDesA <sub>up</sub>  | TTT AAT <u>TCA</u> TAT GAC TGC<br>CAC GAT TCC CCC GTT        | 67.0                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesA</i> |
| SyDesA <sub>low</sub> | CCG <u>CTC</u> <u>GAG</u> AAC TTT TTT<br>CAG GGA GCC GAA GGT | 72.0                   | 33            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesA</i> |

**Tab. II-4: Verwendete Primer (Fortsetzung)**

| Name                        | Sequenz (5' → 3')  | T <sub>m</sub><br>(°C) | Länge<br>(bp) | Verwendung  |
|-----------------------------|--|------------------------|---------------|---|
| SyDesB <sub>up</sub>        | GGG ATA <u>TAC ATA</u> TGC GTC<br>TAG AAA TTT CAT CGC C  | 67.1                   | 34            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesB</i>                     |
| SyDesB <sub>low</sub>       | CCG <u>CTC GAG</u> AGG TTT CTT<br>TTG ATA TCC ACC AT     | 68.2                   | 32            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesB</i>                     |
| SyDesC <sub>up</sub>        | CCC CCT <u>TCA TAT</u> GTT AAA<br>CCC ATT AAA CAT TGA    | 64.5                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesC</i>                     |
| SyDesC <sub>low</sub>       | TTT <u>CTC GAG</u> GGC TTT GTT<br>GGC CAT CGC AGT TT     | 69.5                   | 32            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesC</i>                     |
| SyDesD <sub>up</sub>        | GGG AAT <u>TCA TAT</u> GCT AAC<br>AGC GGA AAG AAT TAA    | 64.5                   | 33            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesD</i>                     |
| SyDesD <sub>low</sub>       | TTT <u>CTC GAG</u> CGA TGC TTT<br>GCC CAT GGC CTC TA     | 70.8                   | 32            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens<br><i>SydesD</i>                     |
| YFP-H <sub>up</sub>         | GGG ATA <u>CAT ATG</u> GTG AGC<br>AAG GGC GAG GAG CTG TT | 74.0                   | 35            | Upper Primer zur<br>Amplifikation des Gens <i>yfp</i><br>ohne Terminationscodon |
| YFP-H <sub>low</sub>        | TAG <u>CTC GAG</u> CTT GTA CAG<br>CTC GTC CAT GCC GA     | 75.2                   | 32            | Lower Primer zur<br>Amplifikation des Gens <i>yfp</i><br>ohne Terminationscodon |
| RT-ApC <sub>left</sub>      | TGC TGA TGT TCC CCG CTT TA                               | 62,5                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>ApdesC</i>                               |
| RT-<br>ApC <sub>right</sub> | GGA AAA AGA TGC CCC AGA<br>CG                            | 59,8                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>ApdesC</i>                              |
| RT-ApD <sub>left</sub>      | CGT GAT AAC CCG CCC ATG TA                               | 58,3                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>ApdesD</i>                               |
| RT-<br>ApD <sub>right</sub> | GAC GGC GGA AAC TCC AAA<br>AC                            | 60,1                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>ApdesD</i>                              |
| RT-BsA <sub>left</sub>      | CCT GCA ATC ACT TGC GTT CC                               | 60,5                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>BsdesA</i>                               |

**Tab. II-5: Verwendete Primer (Fortsetzung)**

| Name                    | Sequenz (5' → 3')                | T <sub>m</sub><br>(°C) | Länge<br>(bp) | Verwendung   |
|-------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------|--|
| RT-BsA <sub>right</sub> | TCT GGT GAA TCA GGC GGA<br>AG    | 59,4                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>BsdesA</i> |
| RT-SaA <sub>left</sub>  | GGA ACC ATC CCG AGC TTC<br>AG    | 57,9                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>SadesA</i>  |
| RT-SaA <sub>right</sub> | AGG AGA CCA GTC GGC GTT<br>TC    | 58,4                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>SadesA</i> |
| RT-SyA <sub>left</sub>  | GGT CCC TTC TGG TGG ACT GG       | 63,5                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>SydesA</i>  |
| RT-SyA <sub>right</sub> | CCG CAA ACA GGA AGA CAA<br>CG    | 59,4                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>SydesA</i> |
| RT-SyB <sub>left</sub>  | TGA TCG GGA TTA CGG CTT CA       | 57,3                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>SydesB</i>  |
| RT-SyB <sub>right</sub> | TGG GCT TGA TGG CTT CAG TC       | 59,4                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>SydesB</i> |
| RT-SyC <sub>left</sub>  | TGG TTT GCA ATG GTG GGA<br>AG    | 57,3                   | 20            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>SydesC</i>  |
| RT-SyC <sub>right</sub> | ATC GCA GTT TCC GGA GGA<br>AG    | 59,4                   | 20            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>SydesC</i> |
| RT-SyD <sub>left</sub>  | TAC CTC TGG CTC TGG GCT<br>TTT C | 62,1                   | 22            | Linker RT-PCR-Primer für das<br>Gen <i>SydesD</i>  |
| RT-SyD <sub>right</sub> | AAC ACA TGG GCC AGC ATA<br>AAG A | 58,4                   | 22            | Rechter RT-PCR-Primer für<br>das Gen <i>SydesD</i> |

## 4 Nährmedien und Zusätze

### 4.1 Sterilisation von Nährmedien und Zusätzen

Die Sterilisation von Nährmedien und steril zu verwendender Zusätze erfolgte durch Autoklavieren (21min, 200 kPa, 121°C).

Hitzelabile Komponenten, z. B. Antibiotika, wurden stattdessen sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter, Porendurchmesser 0,2 µm). Vor der Zugabe dieser Komponenten wurde das verwendete Medien zunächst abgekühlt, bis es nicht mehr als handwarm war.

## 4.2 *E. coli* Medien

Alle Medien wurden wie in II-4.1 angegeben autoklaviert.

### *LB-Vollmedium (flüssig) (1000 ml)*

|             |         |
|-------------|---------|
| Trypton     | 10,00 g |
| Hefeextrakt | 5,00 g  |
| NaCl        | 5,00 g  |

### *LB-Agar (1000 ml):*

|             |         |
|-------------|---------|
| Trypton     | 10,00 g |
| Hefeextrakt | 5,00 g  |
| NaCl        | 5,00 g  |
| Agar        | 15,00 g |

### *M9-Minimalmedium (1000 ml):*

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 6,00 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 3,00 g |
| NaCl                             | 0,50 g |
| NH <sub>4</sub> Cl               | 1,00 g |

Nach dem Autoklavieren wurden dem M9-Medium noch folgende Zusätze (welche zuvor separat autoklaviert wurden) zugefügt:

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| 50 % Glucose                   | 8,00 ml  |
| 10mM FeCl <sub>3</sub> (s. u.) | 5,00 ml  |
| 0,1 % Thiamin                  | 0,50 ml  |
| 5 % Casaminosäuren             | 20,00 ml |

### *10mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung für M9-Minimalmedium (100 ml):*

|                   |          |
|-------------------|----------|
| FeCl <sub>3</sub> | 27,03 mg |
| 32% HCl           | 2,00 ml  |

## 4.3 *R. capsulatus* Medien

Alle Nährmedien wurden sterilisiert, wie in II-4.1 angegeben.

### *PY-Agar (1000 ml):*

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Bacto Pepton                   | 10,00 g |
| Hefeextrakt                    | 0,50 g  |
| Agar                           | 15,00 g |
| 1 M MgCl <sub>2</sub>          | 2,00 ml |
| 1 M CaCl <sub>2</sub>          | 2,00 ml |
| 0,5% FeSO <sub>4</sub> (s. u.) | 2,40 ml |

*PY-Medium für Konjugationen (1000 ml):*

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Bacto Pepton          | 10,00 g |
| Hefeextrakt           | 0,50 g  |
| 1 M MgCl <sub>2</sub> | 2,00 ml |
| 1 M CaCl <sub>2</sub> | 2,00 ml |

*PYG-Puffer (1000 ml):*

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Bacto Pepton            | 3,00 g  |
| Hefeextrakt             | 3,00 g  |
| 20 % MgCl <sub>2</sub>  | 2,50 ml |
| 7,5 % CaCl <sub>2</sub> | 4,00 ml |

*RCV-Minimalmedium (1000 ml):*

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| 10% DL-Malat (pH 6,8)           | 40,00 ml |
| 1 % EDTA                        | 2,00 ml  |
| 20 % MgSO <sub>4</sub>          | 1,00 ml  |
| Spurenelement-Lösung (s. u.)    | 1,00 ml  |
| 7,5 % CaCl <sub>2</sub>         | 1,00 ml  |
| 0,5 % FeSO <sub>4</sub> (s. u.) | 2,40 ml  |
| 0,1 % Thiamin                   | 1,00 ml  |

Das Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen folgende (getrennt autoklavierten) Zusätze hinzugefügt:

|  |          |
|--|----------|
| 10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 10,00 ml |
| 1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8 (s. u.)                  | 9,60 ml  |

*0,5% FeSO<sub>4</sub> für RCV und PY-Medium (200 ml):*

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| FeSO <sub>4</sub> | 0,50 % (w/v) |
| 32%ige HCl        | 1,00 ml      |

*Phosphatpuffer (pH 6,8) für RCV-Medium (500 ml):*

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 81,30 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 78,70 g |

*Spurenelement-Lösung für RCV (250 ml):*

|  |        |
|--|--------|
| MnSO <sub>4</sub> · 1 H <sub>2</sub> O                 | 0,40 g |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 0,70 g |
| Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3 H <sub>2</sub> O | 0,01 g |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | 0,06 g |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 0,02 g |

#### 4.4 *Synechocystis* Medium

*BG-11 Medium (1000 ml):*

|  |         |
|--|---------|
| NaNO <sub>3</sub>                                    | 1,50 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O | 0,04 g  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O               | 0,075 g |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O               | 0,036 g |
| Zitronensäure  | 0,006 g |
| Eisen-Ammonium-Zitrat                                | 0,006 g |
| EDTA   | 0,001 g |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                      | 0,02 g  |
| Spurenelement-Lösung A5+Co (s. u.)                   | 1,00 ml |

Der pH nach dem Autoklavieren und Abkühlen sollte 7,4 betragen. Das Medium wurde anschließend mit 20mM Hepes-NaOH supplementiert.

*Spurenelement-Lösung A5+Co (1000 ml):*

|  |         |
|--|---------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 2,86 g  |
| MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O                 | 1,81 g  |
| ZnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                 | 0,222 g |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 0,390 g |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                 | 0,079 g |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O | 0,049 g |

#### 4.5 *Arthrospira platensis* Medium

*Arthrospira platensis* Medium:

Lösung 1 und Lösung 2 wurden separat autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt.

Lösung 1 (500 ml):

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| NaHCO <sub>3</sub>              | 13,61 g |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 4,03 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,50 g  |

Lösung 2 (500 ml):

|   |         |
|---|---------|
| NaNO <sub>3</sub>                       | 2,50 g  |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>          | 1,00 g  |
| NaCl                                    | 1,00 g  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O  | 0,20 g  |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 0,04 g  |
| FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O  | 0,01 g  |
| EDTA                                    | 0,08 g  |
| <i>Arthrospira</i> Spurenelement-Lösung | 5,00 ml |

*Arthrospira Spurenelement-Lösung (1000 ml):*

|  | Stocklösung [g/ 100ml] | eingesetzt |
|--|------------------------|------------|
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | 0,10                   | 1,00 ml    |
| MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O                 | 0,10                   | 2,00 ml    |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 0,20                   | 5,00 ml    |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O | 0,02                   | 5,00 ml    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 0,02                   | 5,00 ml    |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                 | 0,0005                 | 1,00 ml    |

Nach der Zugabe des destillierten Wassers wurden noch folgende Komponenten zugegeben:

|  |        |
|--|--------|
| FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 0,70 g |
| EDTA                                   | 0,80 g |

Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

#### 4.6 *Stappia aggregata* Medium

*Bacto Marine Broth (1000 ml):*

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Bacto Pepton                      | 5,00 g   |
| Bacto Hefeextrakt                 | 1,00 g   |
| Fe(III) Citrat                    | 0,10 g   |
| NaCl                              | 19,45 g  |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 5,90 g   |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 3,24 g   |
| CaCl <sub>2</sub>                 | 1,80 g   |
| KCl                               | 0,55 g   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>   | 0,16 g   |
| KBr                               | 0,08 g   |
| SrCl <sub>2</sub>                 | 34,00 mg |
| H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>    | 22,00 mg |
| Natrium-Silikat                   | 4,00 mg  |
| NaF                               | 2,40 mg  |
| (NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub> | 1,60 mg  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 8,00 mg  |

Der pH des Mediums sollte nach dem Autoklavieren und Abkühlen 7,6 betragen.



*DNA-Probenpuffer (5x):*

|          |               |
|----------|---------------|
| EDTA     | 100,00 mM     |
| Glycerol | 43,00 % (v/v) |
| BPB      | 0,05 % (w/v)  |

*DNA-Molekulargewichtsstandards:*

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, ready to use von Fermentas: kb 10,0 - 8,0 - 6,0 - 5,0 - 4,0 - 3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,5 - 1,0 - 0,75 - 0,5 - 0,25

## 6.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

*Mg<sup>2+</sup>-Mix*

|                   |        |
|-------------------|--------|
| MgCl <sub>2</sub> | 500 mM |
| MgSO <sub>4</sub> | 500 mM |

*Transformationspuffer (TMF):*

|                   |        |
|-------------------|--------|
| CaCl <sub>2</sub> | 100 mM |
| RbCl <sub>2</sub> | 50 mM  |
| MnCl <sub>2</sub> | 40 mM  |

## 6.3 Puffer und Lösungen für die Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

*SDS-Probenpuffer:*

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 4 x Sammelgelpuffer | 1,25 ml |
| 87 % Glycerol       | 1,20 ml |
| 10 % SDS            | 3,00 ml |
| β-Mercaptoethanol   | 0,50 ml |
| 0,5 % BPB           | 0,60 ml |
| H <sub>2</sub> O    | 2,65 ml |

*Sammelgelpuffer (200 ml):*

|                  |         |
|------------------|---------|
| Tris-HCl, pH 6,8 | 12,20 g |
|------------------|---------|

*Trenngelpuffer (200 ml):*

|                  |         |
|------------------|---------|
| Tris-HCl, pH 8,8 | 36,40 g |
|------------------|---------|

*12% SDS-Trenngel (Mengenangaben für 2 Mini- Gele)*

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Acrylamid         | 4,00 ml  |
| Glycerin          | 3,40 ml  |
| 4x Trenngelpuffer | 2,50 ml  |
| 10% SDS           | 0,10 ml  |
| 10% APS           | 50,00 µl |
| TEMED             | 10,00 µl |

*5% SDS-Sammelgel (Mengenangaben für 2 Mini-Gele):*

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Acrylamid          | 0,83 ml  |
| 4x Sammelgelpuffer | 1,25 ml  |
| 10% SDS            | 50,00 µl |
| A. dest            | 2,90 ml  |
| 10% APS            | 50,00 µl |
| TEMED              | 10,00 µl |

*10 x SDS-Laufpuffer (pH 8,3) (1000 ml):*

|          |          |
|----------|----------|
| Tris-HCl | 30,30 g  |
| Glycin   | 144,00 g |
| SDS      | 10,00 g  |

*Marker:* Precision Plus Protein Standard Dual Color (Firma Biorad) (Banden bei 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa)

## **6.4 Puffer und Lösungen für Immunoblotting (Western Blot)**

*20x TBS-Puffer (500 ml):*

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Tris              | 60,50 g |
| NaCl              | 87,60 g |
| MgCl <sub>2</sub> | 2,00 g  |

Die Lösung wird mit konzentrierter HCl auf einen pH von 6,8 eingestellt (dabei verschwindet die anfängliche Trübung).

*TBST-Puffer:*

|                 |             |
|-----------------|-------------|
| 20x TBS (s. o.) | 50 ml       |
| A. dest.        | 950 ml      |
| Tween 20        | 0,2 % (v/v) |

*Blockierlösung:*

|                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
| Nachweis von YFP:         | TBST + 1,50 % Milchpulver |
| Nachweis von Desaturasen: | TBST + 0,75 % Milchpulver |

*10x Dunn-Carbonat-Puffer (pH 9,45) (1000 ml):*

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| NaHCO <sub>3</sub>              | 8,4 g  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 3,18 g |

*1x Dunn-Carbonat-Puffer (kurz vor Gebrauch ansetzen):*

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| 10 x Dunn-Carbonat-Puffer | 100 ml |
| Methanol                  | 200 ml |
| H <sub>2</sub> O          | 700 ml |

## 6.5 Nachweis von Proteinen durch Färbereaktionen

*Amidoschwarz-Färbelösung:*

|              |              |
|--------------|--------------|
| Amidoschwarz | 0,1 % (w/v)  |
| Ethanol      | 45,0 % (v/v) |
| Essigsäure   | 10,0 % (v/v) |
| A. dest.     | 45,0 % (v/v) |

*Coomassie Blau-Färbelösung:*

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| Coomassie Brilliant Blue | 0,1 % (w/v)  |
| Ethanol                  | 42,0 % (v/v) |
| Essigsäure               | 16,0 % (v/v) |
| A. dest.                 | 42,0 % (v/v) |

*Coomassie Blau-Entfärbelösung:*

|            |              |
|------------|--------------|
| Ethanol    | 20,0 % (v/v) |
| Essigsäure | 7,0 % (v/v)  |
| A. dest.   | 73,0 % (v/v) |

*ECL-Lösungen zum Chemolumineszenznachweis von Proteinen:*

Lösung A: 30% Wasserstoffperoxid

Lösung B: 11mg p-Cumarsäure in 10 ml DMSO

Lösung C: 50mg Luminol in 500 ml 100mM Tris-HCl (pH 8.6)

## 6.6 Puffer zur Aufreinigung löslicher Proteine

*Lysepuffer (pH 8,0):*

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 50 mM  |
| NaCl                             | 300 mM |
| Imidazol                         | 10 mM  |

*Waschpuffer (pH 8,0):*

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 50 mM  |
| NaCl                             | 300 mM |
| Imidazol                         | 20 mM  |

*Elutionspuffer (pH 8,0):*

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 50 mM  |
| NaCl                             | 300 mM |
| Imidazol                         | 250 mM |

## 6.7 Resuspensionspuffer

*SP-Puffer (pH 7,2):*

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 40mM  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 22mM  |
| NaCl                            | 150mM |

## 6.8 Lösungen zur quantitativen Bestimmung von Proteinmengen

*Bradford-Lösung:*

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Coomassie Brilliant Blue G 250 | 100 mg |
| Ethanol                        | 50 ml  |
| 86% Phosphorsäure              | 100 ml |

Die Lösung wurde eine Stunde gerührt und dann Feststoffe über einen Faltenfilter abgetrennt. Dann wurde die Lösung über Nacht stehen gelassen, damit sich noch verbleibende Schwebeteilchen absetzen konnten.

## 6.9 Lösungen zur gaschromatographischen Analyse

*KCl-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung:*

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| KCl                            | 1,0 M |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 0,2 M |

*Dichlormethan-Lösung:*

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Dichlormethan      | 200 ml |
| Methanol (GC-rein) | 200 ml |
| Ameisensäure       | 20 ml  |

Methanolische  $H_2SO_4$ : 10%  $H_2SO_4$  in Methanol

Verwendeter externer Fettsäure-Standard:

C4:0 bis C22:6 (37 Spezies)

37 Component FAME Mix (Supelco)

## 7 Chemikalien

Tab. II-7: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie                                       | Hersteller |
|--|------------|
| Aceton   | Roth       |
| Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1                    | Roth       |
| Agar   | Invitrogen |
| Agarose  | Roth       |
| Amidoschwarz                                     | Merck      |
| APS (Ammoniumperoxidsulfat)                      | Roth       |
| Ammoniumsulfat                                   | Merck      |
| Bacto Pepton                                     | BD         |
| Bacto Trypton                                    | Sigma      |
| Bacto Hefeextrakt                                | BD         |
| Borat  | Merck      |
| Brij 58  | Sigma      |
| Bromphenolblau                                   | Serva      |
| Butylhydroxytoluen-Lösung (1%)                   | AppliChem  |
| Calciumchlorid                                   | Merck      |
| Casein-Hydrolysat, Protein-Hydrolysat N-Z Amin A | Fluka      |
| <i>cis</i> -Vaccensäure                          | Larodan    |
| DMSO   | Sigma      |
| DL-Malic Acid                                    | Sigma      |
| EDTA (Titrplex)                                  | Merck      |
| Essigsäure                                       | Merck      |
| Ethidiumbromid                                   | Sigma      |
| Glycin   | Roth       |
| Linolsäure (freie Fettsäure)                     | Sigma      |
| Linolsäure (Natriumsalz)                         | Sigma      |

Tab. II-8: Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

| Chemikalie   | Hersteller               |
|--|--------------------------|
| Magermilchpulver   | Merck                    |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                     | Sigma                    |
| Methanol   | Roth                     |
| Methylheptadecansäure  | Fluka                    |
| Natriumsulfat, wasserfrei                                    | Fluka                    |
| Ölsäure (freie Fettsäure)                                    | Sigma                    |
| Ölsäure (Natriumsalz)  | Sigma                    |
| Omacor <sup>TM</sup> Kapseln (Präparat mit EPA/ DHA)         | Solvay Arzneimittel GmbH |
| Proteaseinhibitor Complete, EDTA-frei                        | Roche                    |
| SDS (Natriumdodecyl-Sulfat)                                  | Roth                     |
| Tonalin <sup>TM</sup> (Präparat mit konjugierter Linolsäure) | Cognis GmbH & Co. KG     |

Alle Chemikalien wurden in ausreichender Reinheit für molekularbiologische Arbeiten bezogen. Weitere Chemikalien wurden von diversen Firmen im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen.

## 8 Reaktions- und Nachweis-Kits

|  |                  |
|--|------------------|
| DNase Kit, RNA-free                        | Promega          |
| DNEasy Blood & Tissue Kit                  | Qiagen GmbH      |
| innuPrep Plasmid Mini Kit                  | Analytik Jena    |
| innuPrep DOUBLEpure Kit                    | Analytik Jena    |
| Nucleobond Xtra Midi Plus Kit              | Macherey & Nagel |
| Phusion Polymerase Kit                     | Finnzymes        |
| Quanti-Tect SYBR-Green one step RT PCR Kit | QIAGEN GmbH      |
| RNeasy Mini Kit                            | QIAGEN GmbH      |

## 9 Geräte und Materialien

### Materialien:

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Microbiology Anaerocult A             | Merck               |
| Cellulose-Acetate-Filter, 0,2 $\mu$ m | Schleicher & Schüll |
| PVDF-Membran                          | Biorad              |
| 4-12% Bis-Tris NUPAGE Fertiggele      | Invitrogen          |

Geräte:

Tab. II- 9: Verwendete Geräte

| Gerät  | Hersteller   |
|--|--------------|
| BioPhotometer  | Eppendorf    |
| Blotapparaturen (mini-) trans-Blot Elektrophoretic Transfer Cell   | BioRad       |
| Dokumentationssystem für Agarosegelelektrophorese (Eagle Eye II)   | Stratagene   |
| Elektrophoreseapparaturen Mini-Protean Gelkammer II™   | BioRad       |
| Elektrophoresekammer XCell SureLock™ Electrophoresis Cell  | Invitrogen   |
| Fluoreszenz-Spektrometer LS 50B  | Perkin Elmer |
| French Press Cell Disruptor  | Thermo       |
| French Pressure Cell 40K (1“ Stempelquerschnitt)   | Thermo       |
| Gaschromatograph 6890N Network GC System   | Agilent      |
| Gaschromatographiesäule WCOT Fused Silica/ CP-Sil 88 (Länge 100m, Innendurchmesser 0,25mm, Beschichtungsdicke 0,2µm) | Varian       |
| STELLA   | Raytest      |
| PCR-Automat ep gradient S  | Eppendorf    |
| RT-PCR-Automat realPlex <sup>4</sup> Mastercycler epgradient S   | Eppendorf    |
| Spektrophotometer Genesys 6  | Thermo       |
| Spannungsgeber PowerPAC 300  | BioRad       |
| Thermoblock Thermomixer Comfort  | Eppendorf    |

Alle hier nicht aufgeführten Geräte und Materialien entsprechen den üblichen Laborstandards.

Software:

Clone-Manager 7.0

Scientific & Educational Software

AIDA

Raytest

Graphical Codon Usage Analyzer 2.0

www.gcuu.com

**Alle in dieser Arbeit dargestellten Immunoblot- und Agarosegel-Abbildungen wurden unter Zuhilfenahme elektronischer bildverarbeitender Medien erstellt. Die Abbildungen enthalten ausschließlich originale Daten. Eine inhaltsverändernde Bildbearbeitung ist nicht vorgenommen worden.**

## 10 Mikrobiologische Methoden

### 10.1 Bakterienanzucht

#### 10.1.1 Anzucht von *E. coli*

Für die Expression heterologer Proteine in *E. coli* wurden zunächst 5 bis 10 ml selektiven LB-Mediums mit einer Einzelkolonie von einer frischen Transformationsplatte beimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C auf einem Brutroller bei 120 rpm inkubiert. Für die Hauptkulturen wurden Erlenmeyer-Schüttelkolben mit selektivem M9-Medium (Volumen versuchsabhängig) zu einer Konzentration von 1% aus der Vorkultur beimpft. Anschließend wurden die Kulturen auf einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 120 rpm für eine vom Experiment abhängige Dauer inkubiert. Im Fall der T7-abhängigen Expression wurden die Kulturen beim Erreichen einer OD<sub>580</sub> von 0,5 mit 1mM IPTG induziert und danach noch für vier weitere Stunden inkubiert.

#### 10.1.2 Anzucht von *R. capsulatus*

*Auf Festmedium:*

Die Kultivierung von *R. capsulatus* auf Festmedien erfolgte auf Platten von PY-Agar, gegebenenfalls mit beigefügtem Antibiotikum. Nach dem Ausstreichen der Bakterien wurden die Platten in speziellen Anaerob-Inkubationstöpfen unter Verwendung des Microbiology Anaerocult A (Merck) im Starklicht für zwei bis drei Tage inkubiert.

*Vorkulturen:*

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte entweder in gasdicht verschließbaren Röhrchen („Hungates“, Volumina bis 15ml) oder in mit Gummistopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben (größere Volumina). Als Medium wurde RCV-Flüssigmedium verwendet und gegebenenfalls ein geeigneter Selektionsdruck angelegt. Eine kleine Menge Zellen von einer PY-Agarplatte wurde in das Medium überführt, um die Vorkultur zu inokulieren. Die Gefäße wurden dann luftdicht verschlossen und durch fünf Minuten Begasung mit Stickstoff Sauerstoff aus dem Totvolumen entfernt. Die Inkubation erfolgte über zwei Tage.

*Anaerobe, photoheterotrophe Anzucht unter Starklichtbedingungen:*

Phototroph anzuziehende Hauptkulturen von *R. capsulatus* wurden je nach benötigtem Volumen in Hungate-Röhrchen (bis 15 ml), in Flaschen unter ständigem Rühren (50 bis 250ml) oder in Flächeninkubatoren (600ml) angeimpft. Als Medium wurde RCV-Flüssigmedium, gegebenenfalls mit Antibiotikum, verwendet. Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte aus einer Vorkultur zu einer optischen Dichte (OD<sub>660</sub>) von 0,02 oder 0,0025 (abhängig vom Experiment). Die Gefäße wurden dann gasdicht verschlossen (durch spezielle Deckel mit Septum oder Gummistopfen mit Septum) und die Kulturen fünf Minuten durch die Septen hindurch mit Stickstoff begast. Die Inkubation erfolgte für

eine versuchsabhängige Dauer zwischen sechs Glühbirnen à 60Watt (entspricht 2500 lux) bei 30°C. Wenn eine T7-abhängige Expression erfolgen sollte, wurden die Kulturen beim Erreichen einer OD<sub>660</sub> von 0,5 mit 12mM Fructose induziert und danach noch für vier weitere Stunden inkubiert.

*Aerobe, heterotrophe Anzucht im Dunkeln:*

Die aerobe Kultivierung erfolgte unter Selektionsdruck in RCV-Minimalmedium in Erlenmeyer-Schüttelkolben in einem vom Experiment abhängigen Kulturvolumen. Die Animpfung der Kulturen erfolgte aus anaerob angezogenen Flüssig-Vorkulturen (wie bei anaerob zu inkubierenden Hauptkulturen). Die Inkubation erfolgte für eine versuchsabhängige Dauer bei 30°C auf einem sorgfältig abgedunkelten Inkubationsschüttler (100rpm). Für eine T7-abhängige Expression wurden die Kulturen gegebenenfalls mit Fructose induziert wie bei der Anzucht unter anaeroben Bedingungen beschrieben.

### **10.1.3 Anzucht von cyanobakteriellen Organismen**

Zur Kultivierung von *Arthrospira platensis* und *Synechocystis* wurde jeweils eine größere Menge Zellen in 20ml des für den betreffenden Organismus spezifischen Mediums (*Arthrospira*-Medium oder BG-11 Medium) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Inkubation erfolgte für sieben Tage bei 30°C zwischen sechs Glühbirnen à 60 Watt (entspricht 2500 lux) unter ständigem Rühren.

### **10.1.4 Anzucht von *Stappia aggregata***

Die Anzucht von *S. aggregata* erfolgte in Reagenzgläsern befüllt mit 5 ml des Mediums Bacto Marine Broth. Inkubiert wurden die Kolben zwei Tage lang bei 28°C im Brutroller (100 rpm).

## **10.2 Konjugativer Transfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* nach *R. capsulatus***

*R. capsulatus* nimmt fremde Plasmide nicht durch Transformation auf. Stattdessen muss der Transfer von Plasmiden in diesen Organismus durch den Vorgang der Konjugation erfolgen.

Die zu übertragenden Plasmide werden zunächst in den konjugationskompetenten *E. coli* Stamm S17-1 transformiert. Am darauf folgenden Tag wird der Rezipient *R. capsulatus* von einer frischen Stammplatte in einer ausreichenden Menge RCV-Flüssigmedium resuspendiert.

In einem sterilen 2 ml Eppendorfgefäß wird 1 ml Suspension vom Rezipienten vorgelegt. Eine kleine Menge des Donors (ca. 20-30 Einzelkolonien) werden in 1 ml eisenfreiem PY-Medium resuspendiert. Dabei muss die Resuspension vorsichtig erfolgen, damit die Pili des Donors erhalten bleiben. Von der Donor-Suspension werden dann 0,5 ml in die Rezipienten-Suspension überführt.

Das Gemisch wird 10 min bei 16.000g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wird für jede Konjugation eine PY-Agarplatte ohne Antibiotikum vorbereitet, indem mittig auf der Platte ein Nitrocellulose-Filter aufgebracht wird.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgenommen und das Pellet dann in diesem Rest resuspendiert. Die Resuspension wird dann auf den Filter auf der PY-Agarplatte plattiert.

Die Platten werden über Nacht bei 30°C im Dunkeln gelagert und anschließend die Filter mit je 1 ml RCV-Flüssigmedium ausgespült. Von dieser Resuspension werden 250 µl abgenommen und auf selektiven PY-Agarplatten plattiert. Die Inkubation erfolgt 3 bis 4 Tage unter phototrophen Bedingungen.

### 10.3 Erzeugung von Gefrierkulturen

Zur Herstellung von Gefrierkulturen von *E. coli* und *S. aggregata* wurden 1,3 ml einer gut durchwachsenen Kultur mit 100 µl DMSO vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Für Gefrierkulturen von *R. capsulatus* wurde von anaeroben PY-Agarplatten eine größere Menge Zellmaterial in 3 ml RCV-Flüssigmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 1,5 ml bei Raumtemperatur 10 min mit 16.000g zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml PYG-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt und das Volumen der Kultur bestimmt. Beide Kulturen wurden 1:1 mit 87 % Glycerol vermenget. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 10.4 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) wurde eine mit destilliertem Wasser verdünnte Probe der Kultur (Verdünnungsfaktor 1:10 bis 1:100 je nach Konzentration der Probe) einer photometrischen Messung mit einem Spektralphotometer unterzogen. Der Nullwert wurde ebenfalls mit H<sub>2</sub>O eingestellt. Für *E. coli* wurde eine Wellenlänge von 580nm verwendet. Eine OD<sub>580</sub> von 1 entspricht etwa  $2 \times 10^9$  Zellen pro ml Kultur. Bei *R. capsulatus* erfolgte die Messung bei 660 nm; dabei entspricht eine OD<sub>660</sub> von 1 ca.  $3 \times 10^8$  Zellen pro ml Kulturvolumen.

### 10.5 Aufschluss von Zellen mittels French Press

Nach der Ernte der Zellen (5000g; *R. capsulatus*: 30min; *E. coli*: 5min) wurden die Zellen mit 0,01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) gewaschen. Zum Waschen von Kulturen, denen Fettsäuren zugesetzt worden waren, wurde dem Waschpuffer 0,1% Brij 58 zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend in einigen Millilitern SP-Puffer resuspendiert und in 50ml Falcon Tubes bis zum Aufschlussvolumen (5 bis 30ml

bis zu einer OD zwischen 5 und 10 in der Suspension) aufgefüllt. Der SP-Puffer wurde für Aufschlüsse von Zellen, die Fettsäure-Desaturasen exprimierten, mit Proteaseinhibitor Complete (Roche, 1 Tablette auf 50ml Puffer) versetzt.

Die French Press Zelle (French Pressure Cell 40K von Thermo, 1“ Stempelquerschnitt) wurde nach den Herstellerangaben zusammengesetzt und die Probe durch Aufziehen in die Zelle überführt. Das Gerät (French Press Cell Disruptor von Thermo) wurde auf einen Zellinnendruck von 550 bar bei Einstellung „high“ eingestellt. Die Probe wurde durch den Auslass zurück in den Probenbehälter gedrückt, wobei über die Stellschraube der Durchlass so reguliert wurde, dass der auf die Zellen wirkende Druck nicht unter 500bar sank. Anschließend wurden die Zellen wieder in die French Press Zelle eingesogen. Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt.

## **10.6 Präparation von Zellfraktionen**

Homogenisate aufgeschlossener Zellen (Kap. II-10.5) wurden mit dieser Methode in die verschiedenen Zellbestandteile aufgetrennt. Je nach Experiment wurden entweder vom Zellhomogenisat und den einzelnen Fraktionen 1 ml Proben entnommen (Pellets wurden dazu in 1ml SP-Puffer, gegebenenfalls versetzt mit Proteaseinhibitor, resuspendiert) oder am Ende der Präparation die Membranfraktionen (in 1ml SP-Puffer resuspendiert) für Analysen der Membranzusammensetzung verwendet und die weiteren Fraktionen verworfen.

Die Zellhomogenisate wurden zunächst 5min bei maximal 2500g zentrifugiert. Das Pellet enthält Zelltrümmer und „inclusion bodies“. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (30min bei 20.000g). Der Überstand ist die Fraktion der löslichen Proteine, das Pellet sind die Membranfraktionen.

## **11 Genetische Methoden**

### **11.1 Ligation von DNA-Fragmenten**

Der Vorgang der Ligation dient dazu, DNA-Fragmente in hydrolysierte Vektor-DNA einzubringen. Dazu wurden 1 U T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer sowie Vektor-DNA und zu insertierende DNA in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 miteinander vermischt. Der Ansatz wurde bei Ligationen von DNA mit überhängenden Enden entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Für die Ligation von „blunt ends“ muss wurde 5 U T4-DNA-Ligase eingesetzt und zum Vermeiden von Konvektionsströmungen im Ansatz die Ligationen entweder zwei Stunden bei 16°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Ligase durch 10minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

## 11.2 Transformation

### 11.2.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Der gewählte *E. coli*-Stamm wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium zu einer stationären Wachstumsphase angezogen und dann von dieser Vorkultur in 100ml LB-Medium, welches zuvor mit 2ml  $Mg^{2+}$  versetzt wurde, in einer Konzentration von 1% angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C inkubiert bis zu einer  $OD_{580}$  von 0,3 bis 0,5. Dann wurde sie auf 4°C heruntergekühlt und während der folgenden Schritte bei dieser Temperatur gehalten. Nachdem die Zellen in einer Kühlzentrifuge (3 min, 4500g, 4°C) pelletiert wurden, wurden sie in 50ml TMF-Puffer (vorgekühlt auf 4°C) resuspendiert. Die Zellen wurden danach für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert und dann erneut pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 10ml 4°C kaltem TMF-Puffer, welcher 20% (v/v) Glycerol enthielt, resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Aliquots zu jeweils 200µl aufgeteilt, welche bei -80°C gelagert wurden.

### 11.2.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für jede Transformation wurde ein Aliquot transformationskompetenter Zellen (II-11.2.1) mit 100 µl eiskaltem TMF-Puffer vermischt. Dieser Suspension wurde anschließend entweder ein zuvor präparierter Ligationsansatz (II-11.1) oder 5 µl isolierter Plasmid-DNA (II-11.3) zugemischt.

Die Zellen wurden für 30min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock (42°C für 1,5 bis 2,5 min abhängig von der Größe des Plasmids) ausgesetzt. Sofort nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz mit 700 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) versetzt. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen danach für einige Zeit bei 37°C auf einem Brutroller inkubiert. Die Dauer dieser Inkubation hing von der durch das Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz ab: Bei Gentamycin waren es vier Stunden, bei den anderen verwendeten Antibiotika zwei Stunden.

Danach wurde die Zellsuspension wiederum 3min bei 16.000g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 800 µl abgenommen und die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert. Dann wurden die Zellen auf selektiven LB-Agar plattiert.

## 11.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Zellkulturen diente das innuPrep Plasmid Mini Kit (Analytik Jena). Größere Mengen von Plasmid-DNA wurden mit dem Nucleobond Xtra Midi Plus Kit (Macherey & Nagel) isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

## **11.4 Methoden zur Charakterisierung von DNA**

### **11.4.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Die hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktion) diente zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder genomischer DNA oder zur Überprüfung neu konstruierter Plasmide.

Von den jeweiligen Restriktionsenzymen wurde 1 Enzymeinheit (Unit) pro  $\mu\text{g}$  DNA in dem vom Hersteller für dieses Enzym oder diese Kombination von Enzymen empfohlenen Puffer eingesetzt. Die Spaltung erfolgte bei einer vom Restriktionsenzym abhängigen Temperatur für 2 Stunden oder über Nacht. Zur Inaktivierung wurden die Ansätze nach dieser Zeit mit  $5\mu\text{l}$  DNA-Probenpuffer (II-6.1) versetzt.

### **11.4.2 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Größenbestimmung hydrolysierter DNA-Moleküle, zur Mengenabschätzung isolierter DNA sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten.

In dieser Arbeit wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8% verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TBE-Lösung (II-6.1) aufgekocht und diese Lösung noch heiß in eine Gelkammer gegossen. Für jeweils 25ml Agaroselösung wurden der Lösung dann sofort  $5\mu\text{l}$  Ethidiumbromid beigemischt und anschließend ein Gelkamm (Anzahl und Größe der Zähne abhängig vom Volumen der aufzutragenden DNA-Probe) eingesetzt. Dann wurde das Gel zur Polymerisation etwa eine halbe Stunde stehen gelassen. Anschließend wurde der Gelkamm entfernt und das Gel in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt. TBE-Puffer (0,5x konzentriert) wurde in die Kammer gegossen, bis das Gel damit überschichtet war. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und mit einer Pipette in die Geltaschen aufgetragen. An das Gel wurde anschließend eine Spannung von 120 V angelegt, bis die gewünschte Trennung erreicht war. Abschließend wurde das Gel mit der Eagle-Eye II-Kamera fotografiert. Die DNA wurde dabei durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 254\text{-}366\text{ nm}$ ) sichtbar gemacht: Das dem Gel zugefügte Ethidiumbromid interkaliert in die Helix doppelsträngiger DNA und emittiert bei einer Bestrahlung mit UV-Licht sichtbares Licht ( $\lambda = 590\text{ nm}$ ), so dass die Lage der DNA-Banden angezeigt wird.

### **11.4.3 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurden  $5\mu\text{l}$  einer präparierten DNA-Probe zusammen mit dem „O'GeneRuler 1 kb ladder“-DNA-Marker (Fermentas) auf einem Agarosegel aufgetragen. Die Stärke der Bande in der DNA-Probe wurde mit den Bandenstärken im DNA-Marker verglichen und anhand der vom Hersteller gegebenen Mengenangaben die DNA-Konzentration in den Proben abgeschätzt.

### 11.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Der Prozess der Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde verwendet, um DNA aus Agarosegelen zurückzugewinnen und in nachfolgenden Versuchen weiter zu verwenden. Das Verfahren wurde auch verwendet um DNA zu reinigen (etwa nach der Amplifikation durch PCR oder zum Umpuffern von zu hydrolysierenden DNA-Proben).

Hydrolysierte DNA-Proben wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit einem Skalpell die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Mittels des innuPrep DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) wurde die DNA dann aus dem Gel isoliert. Zur Reinigung von DNA von Pufferrückständen wurde dasselbe Protokoll verwendet, allerdings ohne die Schritte, die der Auflösung des Gels dienen.

### 11.6 Präparation genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus Bakterien wurden die Zellen nach der für den Organismus üblichen Methode bis zur stationären Phase angezogen. Wurden die Zellen auf Festmedium angezogen, wurde der Zellrasen geerntet und in einer geringen Menge 100mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert, von der 500µl für die Präparation verwendet wurden. Bei Anzucht in Flüssigmedium wurden die Zellen aus 5ml Kultur durch Zentrifugation (10min bei 16.000g) geerntet, das Pellet in etwas Puffer resuspendiert und von dieser Suspension ebenfalls 500µl für die weitere Präparation verwendet. Danach wurde die Isolation der genomischen DNA mit dem DNEasy Tissue Kit von Qiagen nach Herstellerangaben (ausgehend von „Appendix D: Preparation of genomic DNA from gram-negative bacteria“) durchgeführt.

### 11.7 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der *in vivo* Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche.

Zur Durchführung der PCR in dieser Arbeit wurde die Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Polymerase, PCR-Puffer, DMSO und dNTPs entstammten dem Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase-Kit (Finnzymes). Die Reaktionen wurden in dem PCR-Automaten ep gradient S der Firma Eppendorf durchgeführt.

Die verwendeten Primer und ihre Eigenschaften sind in Tab. II-3 aufgelistet.

|                     |                   |         |
|---------------------|-------------------|---------|
| PCR-Ansatz (50 µl): | Template-DNA      | 3,0 µl  |
|                     | Primer A          | 1,0 µl  |
|                     | Primer B          | 1,0 µl  |
|                     | 10mM dNTPs        | 1,0 µl  |
|                     | Phusion HF-Puffer | 10,0 µl |
|                     | DMSO              | 1,5 µl  |
|                     | Polymerase        | 0,5 µl  |

|               |                        |                    |        |
|---------------|------------------------|--------------------|--------|
| PCR-Programm: | Initiale Denaturierung | 98°C               | 30 sec |
|               | Denaturierung          | 98°C               | 30 sec |
|               | Hybridisierung         | Gradient 55 – 65°C | 45 sec |
|               | Elongation             | 72°C               | 1 min  |
|               | Terminale Elongation   | 72°C               | 10 min |

Die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurden in 30 Zyklen wiederholt.

Die DNA wurde schließlich mittels des Gel-Elutions-Kits aufgereinigt (Kap. II-11.5). Die Analyse der amplifizierte DNA erfolgte durch Auftragung von 5 µl PCR-Ansatz auf ein Agarosegel (Kap. II-11.4.2).

### 11.8 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Das Verfahren der RT-PCR diente zur genspezifischen Bestimmung der Transkriptmengen in Zellen, die zur heterologen Überexpression eingesetzt wurden.

Von jeder Kultur wurden direkt nach der Inkubation unter sterilen Bedingungen (Handschuhe, zweifach autoklavierte Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen) 2ml Volumen abgenommen. Die Zellen wurden pelletiert (10min, 16.000g) und sofort bis zur Präparation bei -20°C eingefroren. Zur Gewinnung der mRNA wurden die Proben auf Eis aufgetaut und die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben präpariert. Danach wurden mit einem DNase-Kit (Promega) DNA-Rückstände in den Proben verdaut. Anschließend wurde die Konzentration der RNA in den Proben mit dem BioPhotometer (Eppendorf) mit den Voreinstellungen für RNA-Bestimmung gemessen und auf eine Konzentration von 50ng/µl verdünnt.

Die verwendeten Primer sind in Tab. II-3 aufgelistet. Sie wurden so verdünnt, dass sie im Ansatz eine Endkonzentration von 0,5 pmol/µl erreichten. Von jeder Probe wurden drei Ansätze präpariert: ein voller Ansatz wie unten angegeben, ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (Negativkontrolle) und ein Ansatz, der anstelle der für das untersuchte Gen spezifischen Primer für das *E. coli rpoD*-Gen enthielten.

|                        |                       |         |
|------------------------|-----------------------|---------|
| Ansatz für die RT-PCR: | SYBR Green Mix        | 10,0 µl |
|                        | mRNA                  | 5,0 µl  |
|                        | Primer A + B          | 4,0 µl  |
|                        | Reverse Transkriptase | 0,2 µl  |

Für die RT-PCR wurde der realPlex<sup>4</sup> Mastercycler egradient S (Eppendorf) mit folgenden Einstellungen verwendet:

- Produktlänge 100-150bp
- Primerlänge 18-30bp
- GC-Gehalt 45-65%
- Schmelztemperatur der Primer 63-67°C
- Schmelztemperatur des Produkts 65-85°C

## 12 Proteinbiochemische Methoden

### 12.1 Präparation von Proteinproben für SDS-Gele

Nach der Kultivierung der Expressionskulturen wurden 2ml Probe aus der Kultur entnommen und durch Zentrifugation bei 16.000g (*R. capsulatus*: 10min; *E. coli*: 3min) geerntet. Das Pellet wurde in 1:4 verdünntem Sammelgelpuffer (Kap. II-12.2) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Dann wurde der Ansatz 12min bei 99°C unter ständigem Schütteln (1000rpm) aufgekocht. Die Proben wurden entweder sofort für die SDS-PAGE verwendet (Kap. II-12.2) oder bei -20°C gelagert. In letzterem Fall mussten die Proben nach dem Auftauen nochmals 10 min bei den genannten Bedingungen aufgekocht werden.

### 12.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen in Proteinextrakten nach ihrer Größe.

Die SDS-PAGE wurde entweder mit NUPAGE 4-12% Bis-Tris Fertiggele der Firma Invitrogen durchgeführt (Elektrophoreseapparatur: XCell SureLock™ Electrophoresis Cell) mit einer Laufzeit von 35 min bei 200 V durchgeführt, oder in einer BioRad-Mini-Protein-Gelkammer.

In letzterem Fall wurde zunächst das SDSGel aus Trenngel und Sammelgel gegossen werden (Kap. II-6.3). Aufgrund des Glycerins im Trenngel konnte dieses ohne Polymerisationsphase sofort mit dem Sammelgel überschichtet werden. Nach dem Einsetzen eines Gelkamms mit ausreichend großen Zähnen für die geplanten Proteinproben wurde das Gel ca. 30 min zur Polymerisation stehengelassen. Danach wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Nachdem der Gelkamm entfernt wurde, wurden die Proteinproben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst 15min bei 100 V, und dann mit 200 V, bis der Blaumarker den unteren Gelrand erreichte (ca. 1 Stunde).

Nach dem Gellauf wurden die Gele entweder beim Western Blot Verfahren eingesetzt (Kap. II-12.3) oder durch Coomassie Blau Färbelösung (Kap. II-6.5) die Proteine angefärbt. Für letzteres wurden die Gele 20 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht in Entfärbelösung geschüttelt; die Dokumentation erfolgte mit STELLA (Raytest), die anschließende Bildbearbeitung mit dem Programm AIDA.

### 12.3 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Mit dem Western Blot Verfahren wurden nach der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE die Proteine auf PVDF-Membranen übertragen.

Bei der Verwendung selbst gegossener Gele wurde die Membran zunächst für 1 min in Methanol äquilibriert, dann für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich für mindestens 10 min in 1x Dunn-Carbonatpuffer inkubiert. In der Transferapparatur wurde (basierend auf der schwarzen Fläche) der Blot aufgebaut, indem folgende Komponenten in der genannten Reihenfolge möglichst frei von Luftblasen übereinander geschichtet wurden: Schwamm, 2x Whatman Papier, Gel, Membran, 2x Whatman Papier, Schwamm. Der Aufbau wurde geschlossen und in die Blotkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte zunächst 15 min bei 150 mA und dann weitere 20 min bei 300 mA in Dunn-Carbonatpuffer.

Wurden NUPAGE Fertiggele verwendet, wurde die Membran ebenfalls 1 min lang in Methanol äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte dann nach den Angaben des Herstellers in der XCell SureLock™ Elektrophoresekammer. Der Transfer geschah bei 25 V für 1 h.

Auf PVDF-Membranen übertragene Proteine wurden anschließend entweder durch immunologischen Nachweis spezifisch nachgewiesen (Kap. II-12.4) oder mittels Anfärbung durch Amidoblack (Kap. II-6.5) sichtbar gemacht. Für die Färbung mit Amidoblack wurde die Membran 15min in der Färbelösung inkubiert und dann an der Luft getrocknet.

## 12.4 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBST + 1,5% Milchpulver blockiert, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Nach kurzem Abspülen der Membran mit TBST-Puffer wurde diese eine Stunde bei 30°C unter leichtem Schütteln in TBST, welches mit Anti-His (C-term)-HRP Antikörper (Invitrogen; Konzentration 1 : 5.000) versetzt wurde, inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehreren Waschschritten in TBST unterzogen (15min, 4x 5min), um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Die Detektion erfolgte mittels der ECL-Lösungen. Die Membran wurde luftblasenfrei auf eine klare Plastikunterlage gelegt. In einem Reaktionsgefäß wurden 0,3µl Lösung A vorgelegt. Kurz vor dem Auftrag auf die Membran wurden zunächst 1ml Lösung C und gleich darauf 100µl Lösung B dazugegeben. Die Mischung wurde auf der Membran verteilt und diese in die Kammer des Chemoluminographen gestellt. Die durch die Reaktion der Peroxidaseeinheit des His<sub>6</sub>-Antikörpers mit dem Gemisch entstehende Chemolumineszenz wurde mittels STELLA (Raytest) (Programmeinstellung für YFP: „standard chemoluminescence“, 3min; für Fettsäure-Desaturasen: „sensitive chemoluminescence“, 12min) festgehalten und die Bilder anschließend mit dem Programm AIDA bearbeitet.

Nach dem Chemolumineszenz-Nachweis wurden die Proteine durch 15minütige Inkubation der Membranen in Amidoblack-Lösung (Kap. II-6.5) und anschließende Trocknung über Nacht sichtbar gemacht.

## 12.5 Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach der Detektion der exprimierten Proteine wurden die Membranen für 10 min in eine Amidoschwarz-Färbelösung gelegt, um alle übertragenen Proteine anzufärben. Die Membranen wurden danach, ohne die Färbelösung abzuwaschen, im Abzug getrocknet, wodurch die an die Membran gebundenen Proteine hervortraten.

## 12.6 Aufreinigung von löslichen Proteinen

Zellhomogenisate (Kap. II-10.5) von Kulturen, die das aufzureinigende Protein exprimiert hatten, wurden zur Entfernung unlöslicher Komponenten aus dem Rohextrakt durch 30min bei 16.000g zentrifugiert. Die benötigten Puffer (Kap. II-6.6) wurden in Volumina von mindestens 1 Liter (Lysepuffer 2 Liter) vorbereitet und die verwendete Säule (XK26 Säule von GE Healthcare; Bettvolumen 28ml, Fluss bei 4ml/min), die mit Nickel-NTA-FF Affinitäts-Säulenmaterial (QIAGEN) bepackt war, mit 20 Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert. Puffer und Aufbau wurden auf 4°C gekühlt und alle Aufreinigungsschritte bei dieser Temperatur durchgeführt.

Der gereinigte Rohextrakt wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule mit 150ml Lysepuffer durchspült. Davon wurde eine einzelne Fraktion gesammelt („Durchlauf“). Die Säule wurde dann mit 100ml Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (auch davon wurde eine einzelne Fraktion, „Wash“, gesammelt). Schließlich wurde das aufzureinigende Protein mit drei Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert und mit einem Fraktionssammler in 1ml Fraktionen gesammelt („Eluat“). Die Fraktionen, in denen das aufzureinigende Protein enthalten war (YFP: Identifikation mittels UV-Lampe bei 280nm) wurden vereinigt und das Eluat in einem Vivaspin 20 Tube (Vivascience, Minimalgröße der Proteine 10 kDa) zweimal mit 20ml SP-Puffer gewaschen. Die Lösung wurde schließlich zu einem Volumen von 5 ml aufkonzentriert („Konzentrat“). Das Konzentrat wurde bei -20°C gelagert.

## 12.7 Bradford-Test zur quantitativen Bestimmung von Proteinmengen

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinmengen wurden in einer Küvette 100µl der Probe (gegebenenfalls verdünnt) zu 900µl Bradford-Reagenz (Kap. II-6.8) gegeben und beide Lösungen vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Lösungen erneut vermischt und bei 595nm im Photometer gemessen. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte anhand einer Eichgeraden, die mit unterschiedlichen Konzentrationen BSA erstellt wurde.

## 13 Biophysikalische Methoden

### 13.1 *In vivo*-Fluoreszenzmessung

Zur Bestimmung der Fluoreszenzemission des Fluoreszenz-Reporterproteins YFP wurde die optische Dichte der Expressionskulturen bestimmt, und Zellen entsprechend einer OD von 0,5 durch Zentrifugation (10 min, 16.000g) geerntet. Die Zellen wurden dann in 1 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Zellen aus aerob inkubierten Kulturen konnten sofort für Fluoreszenzmessungen verwendet werden. Proben aus anaerob kultivierten Kulturen dagegen wurden zunächst 2 Stunden lang bei geöffnetem Reaktionsgefäß, Raumtemperatur und 1.000 rpm geschüttelt, um durch Zuführung von Sauerstoff zu den Zellen YFP die autokatalytische Bildung des Fluorophors zu ermöglichen. Von der Probe wurden 750 µl für die Messung verwendet.

Zur Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten des YFP in den Zellen wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzspektrum über den Bereich 515 bis 615 nm aufgezeichnet (Einstellungen am Gerät: excitation slit 12,5; emission slit 15; increment 0; Anregung bei 488 nm; scan speed: 240; Anzahl der Scans: 1). Für die Datenauswertung wurde das Fluoreszenzmaximum von YFP verwendet, welches bei 529,5 nm liegt. Nach der Messung wurden die ermittelten Werte auf eine OD von 1 und 1 ml Probenvolumen hochgerechnet.

### 13.2 Gaschromatographische Analyse von Fettsäure-Methylestern

Zur Bestimmung der Membranzusammensetzung von Bakterien wurden nach der Inkubation die Zellen aufgeschlossen (Kap. II-10.5) und Membranfraktionen präpariert (Kap. II-10.6).

Aus den Membranen wurden zunächst die Lipidkomponenten extrahiert. Dazu wurden 800µl der resuspendierten Membranen in einem Gemisch aus 2 ml KCl-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und 4 ml Dichlormethan-Lösung (Kap. II-6.9) aufgenommen. Die Dichlormethan-Lösung wurde zuvor mit 25µg/ml Methylheptadecansäure als internem Standard und 0,001% Butylhydroxytoluol-Lösung als Antioxidationsmittel versetzt. Das Gemisch aus Probe und Extraktionslösungen wurde durch vortexen gemischt und dann 10min bei 4500g zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Für die weiteren Schritte wurde die Unterphase verwendet.

Der nächste Schritt bestand in der Methylierung der Fettsäuren. In einem 2ml-Reaktionsgefäß wurden 500µl der Unterphase des Extrahierungsschrittes mit 200µl methanolischer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vermischt und dann 30min bei 60°C unter Schütteln (500rpm) inkubiert. Zur Neutralisation wurden anschließend 100µl gesättigte Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 16.000g wurde die Unterphase abgenommen, zur Trocknung mit einer Spatelspitze wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vermengt und erneut zentrifugiert. Die Probe wurde dann in Gaschromatographie-Fläschchen mit 250µl-Einsätzen überführt.

Die gaschromatographische Analyse erfolgte im Gaschromatograph 6890N (Agilent). Als Säule wurde eine WCOT Fused Silica Säule (von Varian; Stationärphase CP-Sil 88 for FAME; Länge 100m, Innendurchmesser 0,25mm, Beschichtungsdicke 0,2µm) verwendet:

|               |                          |               |
|---------------|--------------------------|---------------|
| Ofenprogramm: | Initialtemperatur        | 140°C (5 min) |
|               | Maximaltemperatur        | 240°C         |
|               | Äquilibrierungszeit      | 0,5 min       |
|               | Temperatur-Rampe         | + 3°C/min     |
|               | Endtemperatur            | 240°C         |
|               | Endzeit                  | 15 min        |
|               | Abschließende Temperatur | 50°C          |

### Geräteinstellungen:

- Injector: Waschen mit Probe 2x, Pumpen 4x; Injektionsvolumen 3µl; vor und nach Injektion 2x Waschen mit Dichlormethan.
- Inlet: Modus Split, Anfangstemperatur 260°C; Pressure 2,585 bar; Split Ratio 1:100; Split Fluss 99,9 ml/min; Gesamtfluss 103,4ml/ min, Gas Saver off; Gastyp Helium
- Säule: Modus Konstanter Fluss; Initial-Fluss 1,0 ml/min; Nominaldruck 2,568 bar; Durchschnittsgeschwindigkeit 19cm/ sec; Auslassdruck "ambient".
- Detektor (FID): Temperatur 250°C; Wasserstoff-Fluss 35,0ml/min; Luft-Fluss 400ml/min; Modus Konstanter Säulenfluss/ Makeup-Fluss, Gesamtfluss 10ml/min; Makeup-Gastyp Stickstoff.

### III Ergebnisse

Modifizierte Fettsäuren und Phospholipide spielen als Ausgangsstoffe für industrielle Anwendungen oder als Zusatzstoffe in Ernährungspräparaten und Pharmazeutika in der Bioindustrie eine bedeutende Rolle. Leider kommen viele der für die Bioindustrie interessanten Lipidverbindungen in der Natur nur in geringen Mengen vor oder lassen sich nur unter hohem Aufwand aus den Ursprungsorganismen isolieren (Kap. I-1.1). Eine Alternative zur Gewinnung von Ölen und Fettsäuren stellt die Nutzung prokaryotischer Organismen als Produzenten dieser Verbindungen dar.

In der vorliegenden Arbeit stand die Umsetzung phospholipidgebundener Fettsäuren durch so genannte Fettsäure-Desaturasen im Vordergrund. Diese Fettsäure-modifizierenden Enzyme katalysieren die Umsetzung ungesättigter Fettsäuren (Kap. I-1.3). Als Wirt für die heterologe Expression der Fettsäure-Desaturasen sollte das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus* dienen (Kap. I-3). Zusätzlich sollten durch Expression in *E. coli* komparative Studien zur Produktion von Fettsäure-Desaturasen in beiden Organismen durchgeführt werden.

Für *R. capsulatus* wurden zuvor Expressionsplasmide kloniert, welche zur T7-abhängigen, vergleichenden Expression der heterologen Fettsäure-Desaturasen verwendet werden sollte. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte zunächst dieses neue Expressionssystem durch die Expression des Reporterproteins YFP näher charakterisiert und die Proteinausbeuten quantifiziert werden. Zusätzlich sollten proteasedefiziente Stämme von *R. capsulatus* daraufhin untersucht werden, ob diese Mutationen die Proteinausbeuten in diesem Expressionswirt weiter zu erhöhen vermögen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit bestand das Ziel darin, Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* heterolog zu exprimieren und zur Umsetzung der Fettsäuren in der bakteriellen Membran zu nutzen. Fettsäure-Desaturasen besitzen allerdings zumeist eine hohe Spezifität in Bezug auf ihr Substrat. Diese Anforderungen lassen sich nicht in allen Fällen durch die natürlicherweise in der Membran von *R. capsulatus* vorkommenden Fettsäuren erfüllen. Daher wurde zunächst untersucht, ob es möglich ist, organismusfremde Fettsäuren in die Membran von *R. capsulatus* einzubringen.

Im letzten Teil der Arbeit schließlich sollten verschiedene Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* und *E. coli* überexprimiert werden, um zu zeigen ob *R. capsulatus* für die heterologe Expression dieser Enzyme geeignet ist.

## **1 Charakterisierung und Erweiterung des *R. capsulatus*-basierten Expressionssystems**

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand in der heterologen Expression von Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus*. Dazu sollte das in einer früheren Arbeit erzeugte T7-Expressionssystem von *R. capsulatus* verwendet werden (Katzke, 2006; Katzke et al., 2010). Dieses Expressionssystem besteht zum einen aus einem Set Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Eigenschaften in Bezug auf die Expressionseffizienz sowie die Antibiotikaresistenzen und Fusionstags, und zum anderen aus dem *R. capsulatus* Stamm B10S-T7, welcher die T7-abhängige Expression rekombinanter Zielgene erlaubt.

In mehreren Experimenten sollten durch die Expression des Reporterproteins YFP („yellow fluorescent protein“) die Eigenschaften dieses Expressionssystems näher charakterisiert und quantifiziert werden. Zum einen sollte durch Induktion der Expression des YFP-Gens mit unterschiedlichen Konzentrationen des Induktors Fruktose untersucht werden, ob die Expressionsleistung in diesem System modulierbar ist und mit welcher Fruktosekonzentration die maximale Akkumulation des heterologen Proteins erzielt werden kann. Des Weiteren wurde untersucht, welche Proteinausbeute in *R. capsulatus* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen erzielt werden kann und wie hoch die Expressionseffizienz im Vergleich zu dem etablierten Expressionswirt *E. coli* ist.

### **1.1 Modulation der Expression von Zielgenen durch die Induktorkonzentration *R. capsulatus* B10S-T7**

Die heterologe Expression von Genen kann für den Wirtsorganismus einen starken metabolischen Stress bedeuten oder sogar toxisch wirken (Kap. I-2.1). Ein zuverlässiges Expressionssystem sollte daher strikt reguliert sein, um unerwünschte Akkumulation heterologer Proteine zu verhindern. Auf der anderen Seite kann es für eine optimale Expressionsleistung von Vorteil sein, wenn durch verringerte Konzentrationen des Induktors die Syntheseleistung gesenkt werden kann, da es bei voller Induktion zu einer Überlastung der Faltungs- oder Sekretionsapparats der Zellen kommen kann. Dies kann zur Akkumulation inaktiven Proteins und der Aggregation in „inclusion bodies“ führen.

Zur weiteren Charakterisierung des T7-abhängigen Expressionssystems in *R. capsulatus* sollte daher zunächst das Reporterprotein YFP in *R. capsulatus* B10S-T7 exprimiert werden. Durch

Inkubation des Expressionsstamms unter nicht-induzierenden Bedingungen sollte der basale Level der Expression ermittelt werden. Zusätzlich wurde die Expression von YFP mit unterschiedlichen Mengen des Induktors Fruktose vorgenommen, um festzustellen ob sich die Expressionsleistung dieses Systems durch unterschiedliche Induktorkonzentrationen modulieren lässt.

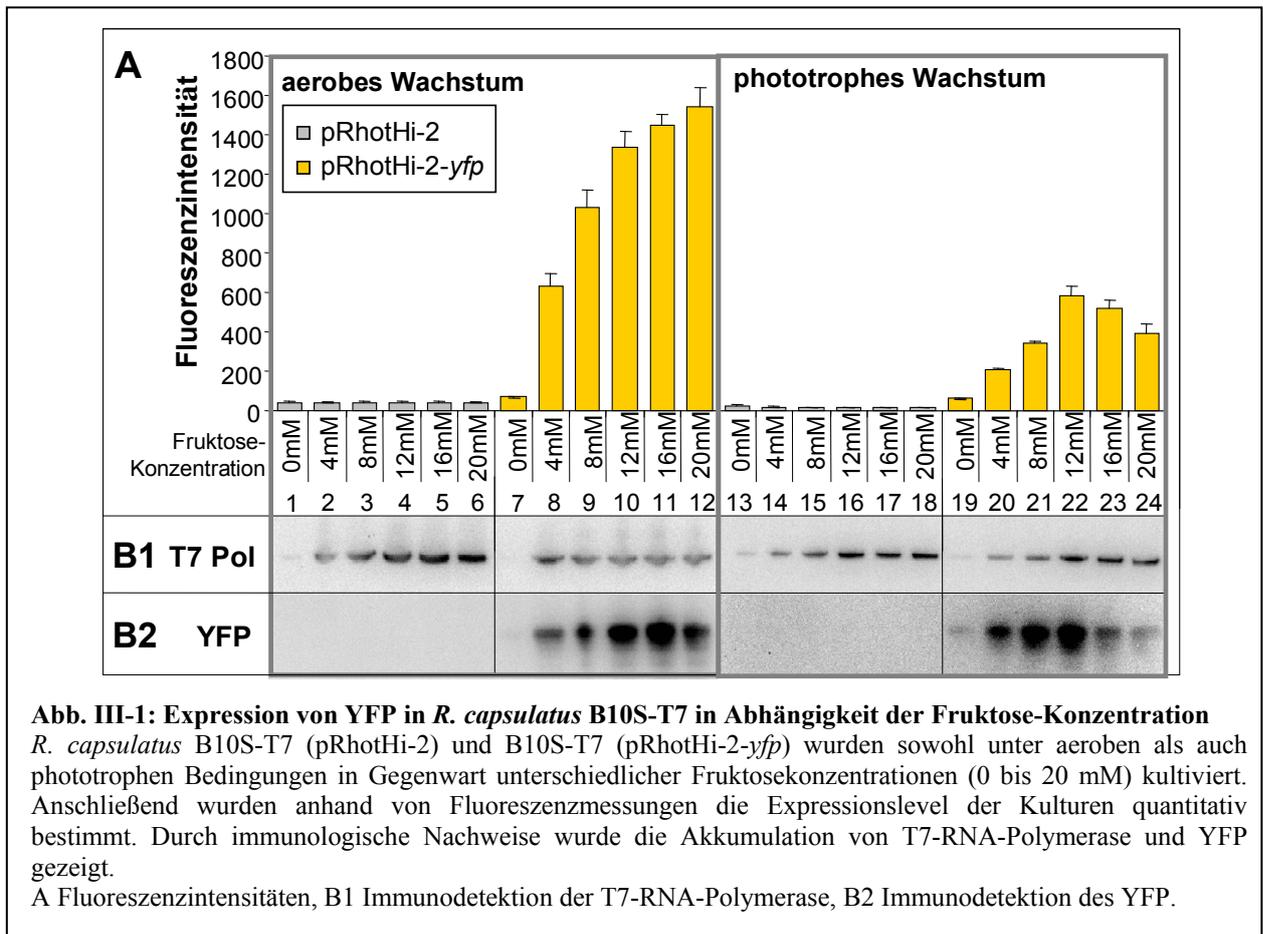
Für diese Untersuchungen wurde der Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 verwendet, der das Gen der T7-RNA-Polymerase in seinem Chromosom trägt und damit ein T7-abhängige Expression vermitteln kann. Zur Expression des YFP-Gens wurde ein Plasmid verwendet, welches auf dem Plasmid pRhotHi-2 basiert, in dem heterologe Zielgene unter die Kontrolle eines T7-abhängigen Promotors gestellt sind. Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 (pRhotHi-2) oder B10S-T7 (pRhotHi-2-*yfp*) wurden in Dreifachbestimmung mit einem Volumen von 15 ml und mit verschiedenen Konzentrationen Fruktose (Endkonzentration 0 bis 20 mM) angeimpft. Die Anzucht erfolgte über zwei Tage sowohl unter anaeroben, phototrophen als auch unter aeroben, chemoheterotrophen Bedingungen (Kap. II-10.1.2). Nach der Inkubation wurden aus jeder Kultur zwei Proben entnommen, die Zellen entsprechend einer OD<sub>660</sub> von 1 in 1ml Kultur enthielten, und anschließend für Fluoreszenzmessungen verwendet (Kap. II-13.1). Anhand der Fluoreszenzintensitäten sollten die Expressionslevel von YFP in den Kulturen quantitativ ermittelt werden. Aus der zweiten Probe wurde ein Gesamtproteinextrakt hergestellt (Kap. II-12.1), die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. II-12.2) und schließlich durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (Kap. II-12.3). Auf den Membranen wurden sowohl YFP als auch die T7 RNA Polymerase mittels spezifischer Antikörper detektiert (Kap. II-12.4). Das Ergebnis der YFP-Expressionsanalysen in Abhängigkeit der Fruktose-Konzentration ist in Abb. III-1 gezeigt.

Unter nicht-induzierenden Bedingungen konnten sowohl unter aeroben als auch unter phototrophen Wachstumsbedingungen auf Proteinebene keine oder nur geringe Mengen T7-RNA-Polymerase nachgewiesen werden (Abb. III-1 B1, Spuren 1, 7, 13, 19). Die Akkumulation von YFP in diesen Kulturen war ebenfalls sehr gering (Abb. III-1 B2, Spuren 7, 19) und resultierte dementsprechend in einer nur schwachen Erhöhung der Fluoreszenz gegenüber den Negativkontrollen unter entsprechenden Wachstumsbedingungen mit 69,94 ( $\pm$  5,65) Fluoreszenzeinheiten unter aeroben Bedingungen und 60,85 ( $\pm$  3,39) Fluoreszenzeinheiten unter phototrophen Bedingungen (Abb. III-1 A, Spuren 7, 19). Vergleicht man die maximale Ausbeute des Reporterproteins YFP (Abb. A, Spuren 12, 22) mit der basalen Expression unter der entsprechenden Wachstumsbedingung (Spuren 7, 19), so ergab sich bei phototrophen Wachstum eine 17-fache und bei aerobem Wachstum eine 39-

fache Erhöhung der *in vivo* Fluoreszenzintensität. Diese Daten verdeutlichen, dass die Expression im Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 unter nicht-induzierenden Bedingungen nahezu vollständig reprimiert ist.

Unter beiden untersuchten Wachstumsbedingungen wurde bei Induktion mit Fruktose sowohl in den Negativkontrollen mit dem leeren Plasmid pRhotHi-2 (Abb. B1, graue Balken) als auch in den Expressionsstämmen mit dem Plasmid pRhotHi-2-*yfp* (Abb. III-1 B1, gelbe Balken) T7 RNA Polymerase akkumuliert. Dies war zu erwarten, da die Expression der T7-RNA-Polymerase eine Eigenschaft des Stammes *R. capsulatus* B10S-T7 ist und nicht von dem Vorhandensein eines Plasmids abhängt. Die Menge der T7-RNA-Polymerase stieg dabei kontinuierlich mit der eingesetzten Fruktosekonzentration.

Dagegen konnte YFP nur in den Kulturen nachgewiesen werden, die das Expressionsplasmid pRhotHi-2-*yfp* enthielten (Abb. III-1 B2, Spuren 7-12, 19-24), während in den Negativkontrollen (Spuren 1-6, 13-18) kein YFP akkumulierte.



In aerob gewachsenen Kulturen stieg die YFP-Ausbeute parallel zur Induktorkonzentration an (Abb. III-1 B2, Spuren 8-12). Dies ging mit einer kontinuierlichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität in den Kulturen einher, die mit 1540,91 ( $\pm$  96,43) Fluoreszenzeinheiten bei einer Fruktosekonzentration von 20 mM ihr Maximum erreichte (Spur 12).

Unter phototrophen Wachstumsbedingungen erhöhte sich die Menge des akkumulierten YFP ebenfalls mit steigender Konzentration des Induktors, allerdings nur bis zu einer Fruktosekonzentration von 12 mM (Abb. III-1 B2, Spuren 20-22). Bei höheren Konzentrationen der Fruktose war die Akkumulation des YFP dagegen schwächer (Spuren 23-24). Die Fluoreszenzintensitäten in den jeweiligen Kulturen zeigten diese Entwicklung ebenfalls: Die Fluoreszenzintensität erhöhte sich mit der Fruktose-Konzentration kontinuierlich auf 584,23 ( $\pm$  50,27) Fluoreszenzeinheiten bei einer Fruktosekonzentration von 12 mM (Abb. III-1 A, Spuren 20-22). Höhere Konzentrationen von Fruktose führten dagegen zu schwächerer Fluoreszenzintensität, was aus der beobachteten Reduktion der Proteinakkumulation resultiert (Spuren 23-24).

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des YFP bei verschiedenen Wachstumsbedingungen zeigte eine weitaus geringere Intensität bei phototroph inkubierten Kulturen (Abb. III-1 A). Unter jeweils optimaler Induktion war die gemessene Fluoreszenzintensität in den aeroben Kulturen etwa 2,5mal höher als in den phototrophen Kulturen. Bemerkenswerterweise unterschied sich allerdings die maximale Akkumulation des YFP auf Proteinebene bei den verschiedenen Wachstumsbedingungen nur gering (Abb. III-1 B2, Spuren 11, 22). Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete geringere Fluoreszenzintensität unter phototrophen Bedingungen auf eine ineffiziente Bildung des YFP-Chromophors zurückzuführen ist, da dieser Prozess sauerstoffabhängig ist (Drepper et al., 2007).

Unter nicht-induzierenden Bedingungen konnte in den Kulturen nur eine basale Expression von YFP beobachtet werden. Die Zugabe von Fruktose zum Medium führte unter aeroben Bedingungen bis zu einer 39-fachen Erhöhung und unter anaeroben Bedingungen bis zu einer 17-fachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Durch unterschiedliche Fruktosekonzentrationen konnte das Expressionslevel von YFP graduell variiert werden, wobei die maximale Ausbeute des Reporterproteins YFP unter anaeroben Wuchsbedingungen mit 12 mM Fruktose und unter aeroben Wachstumsbedingungen mit 20 mM erzielt wurde.

## 1.2 Vergleich der Expressionseffizienz für YFP in *R. capsulatus* B10S-T7 und *E. coli* BL21(DE3)

Das Ziel heterologer Überexpression besteht meist in der Akkumulation möglichst hoher Mengen funktionellen Proteins. Zu diesem Zweck sollte ein Expressionssystem eine hohe Expressionseffizienz besitzen. Um die Effizienz des T7-Systems in *R. capsulatus* B10S-T7 zu untersuchen, sollten die in diesem Organismus erreichbaren Ausbeuten quantifiziert und mit der Ausbeute in dem etablierten T7 Expressionssystem in *E. coli* BL21(DE3) verglichen werden. Dazu sollte das Reporterprotein YFP-His<sub>6</sub> in diesen beiden Organismen überexprimiert und das Protein anschließend über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt werden, um schließlich quantitativ die Proteinausbeuten zu bestimmen.

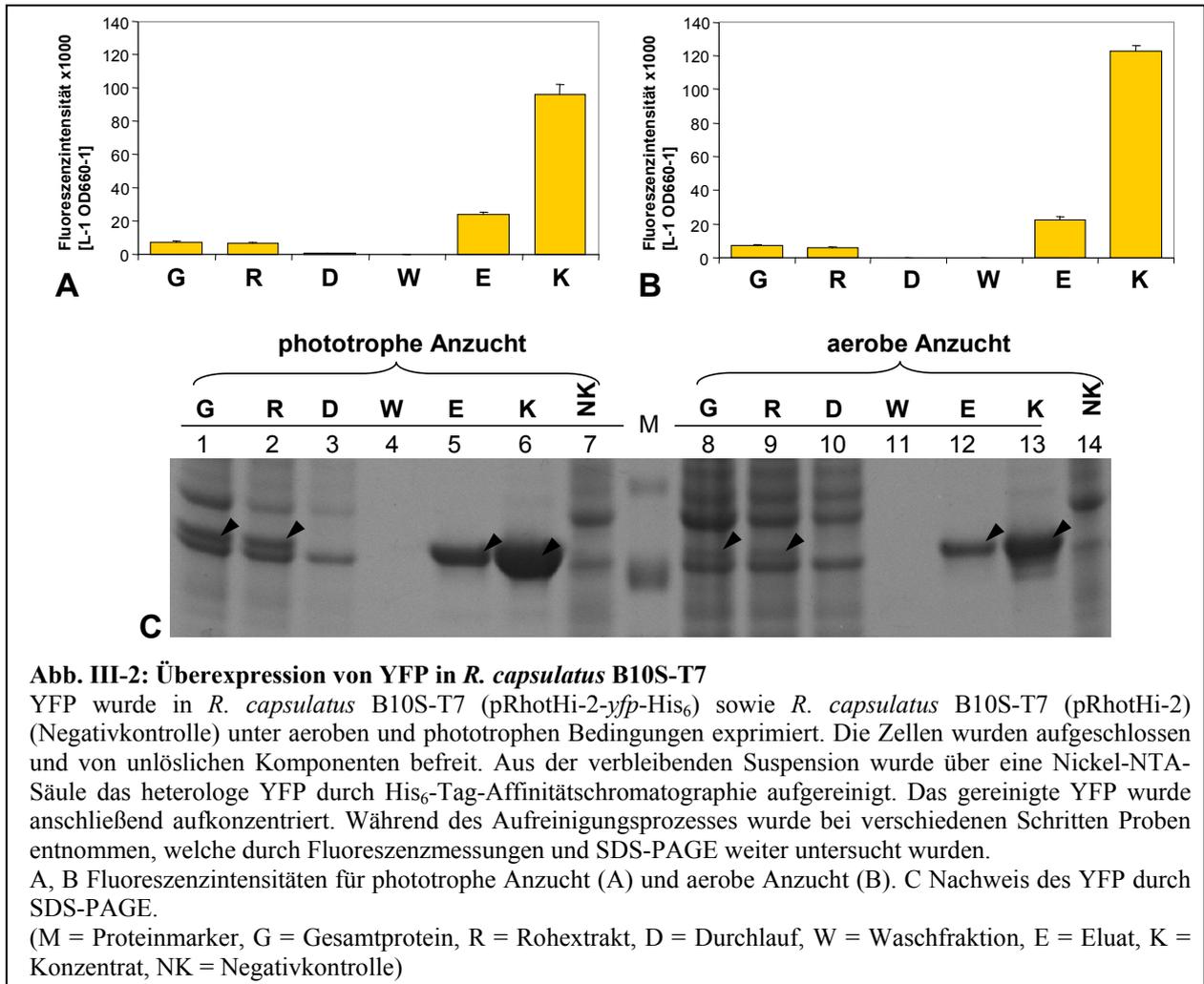
Um YFP in *R. capsulatus* und *E. coli* überzuexprimieren, wurde zunächst ein Derivat des Plasmids pRhotHi-2 kloniert, in welchem das YFP mit einem His<sub>6</sub>-Tag fusioniert wird. Dazu wurde das Gen *yfp* vom Plasmid pRhotHi-2-*yfp* mittels PCR amplifiziert (Kap. II-11.7). Durch die Wahl entsprechender Primer wurde das Gen schließlich in die entsprechenden Schnittstellen der „multiple cloning site“ des Plasmids pRhotHi-2 kloniert, um das Expressionsplasmid pRhotHi-2-*yfp*-His<sub>6</sub> zu erzeugen. Dieses Plasmid wurde in die Expressionsstämme *R. capsulatus* B10S-T7 und *E. coli* BL21(DE3) überführt (Kap. II-11.2, Kap. II-10.2). Diese Stämme wurden dann unter Standardbedingungen für den jeweiligen Organismus (Kap. II-10.1.1, Kap. II-10.1.2) in einem Kulturvolumen von 600 ml bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Dabei wurde die Expression in *R. capsulatus* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, um zu untersuchen ob die Proteinausbeute unter beiden Wachstumsbedingungen vergleichbar ist. Nach der Zellernte wurden die Zellen aufgeschlossen (Kap. II-10.5) und die unlöslichen Bestandteile des Rohextraktes, wie zum Beispiel „inclusion bodies“, durch Zentrifugation (12.000 g, 30 min) abgetrennt. Vom Überstand (welcher die löslichen Zellbestandteile und die Membranen enthielt) wurde 1 ml Probe („Rohextrakt“) für weitere Versuche entnommen und die verbleibende Suspension über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt (Kap. II-12.6). Von den verschiedenen Aufreinigungsschritten („Durchlauf“, Waschfraktion“) wurden ebenfalls jeweils 1 ml Probe entnommen. Unter den gesammelten Fraktionen des Eluats wurden anhand der spezifischen Fluoreszenz jene ausfindig gemacht, welche YFP enthielten und davon 1 ml Probe entnommen („Eluat“). Die gesamte Menge des Eluats wurde anschließend aufkonzentriert. Von diesem Konzentrat wurden ebenfalls Proben entnommen („Konzentrat“). Alle entnommenen Proben wurden zwei Untersuchungen unterzogen: Zum einen wurde die YFP-vermittelte Fluoreszenzintensität in den Proben bestimmt (Kap. II-13.1) und auf eine OD

von 1 und ein Kulturvolumen von 1 L hochgerechnet. Zum anderen wurden die Proteine der ausgewählten Fraktionen in einer SDS-PAGE (Kap. II-12.2) aufgetrennt um die Proteinreinigung zu dokumentieren, und anschließend mit Coomassie-Blau eingefärbt (Kap. II-6.5). Am Ende wurden in den Konzentraten die Proteinmengen durch Bradford-Test bestimmt (Kap. II-12.7), und die YFP-Ausbeute festzustellen.

Die Ergebnisse der Expression in *R. capsulatus* B10S-T7 ist in Abb. III-2 dargestellt.

Die Fluoreszenzintensitäten in den untersuchten Proben zeigten, dass sowohl unter phototrophen (Abb. III-2 A) als auch unter aeroben Kultivierungsbedingungen (Abb. III-2 B) aktives YFP in den Kulturen akkumuliert wurde. Im Konzentrat aus aeroben Kulturen konnte auf einen Liter Kultur einer  $OD_{660}$  von 1 bezogen eine Fluoreszenzintensität von 122.499 ( $\pm$  3.311) Einheiten nachgewiesen werden, im Konzentrat des aus phototroph angezogenen Kulturen konnten 96.274 ( $\pm$  5.941) Fluoreszenzeinheiten erreicht werden. In den Proben von Durchlauf und Waschfraktion konnte keinerlei Fluoreszenz nachgewiesen werden. Das zeigt, dass YFP während der Aufreinigung vollständig an das Säulenmaterial gebunden wurde und es somit keine Verluste des Proteins gab.

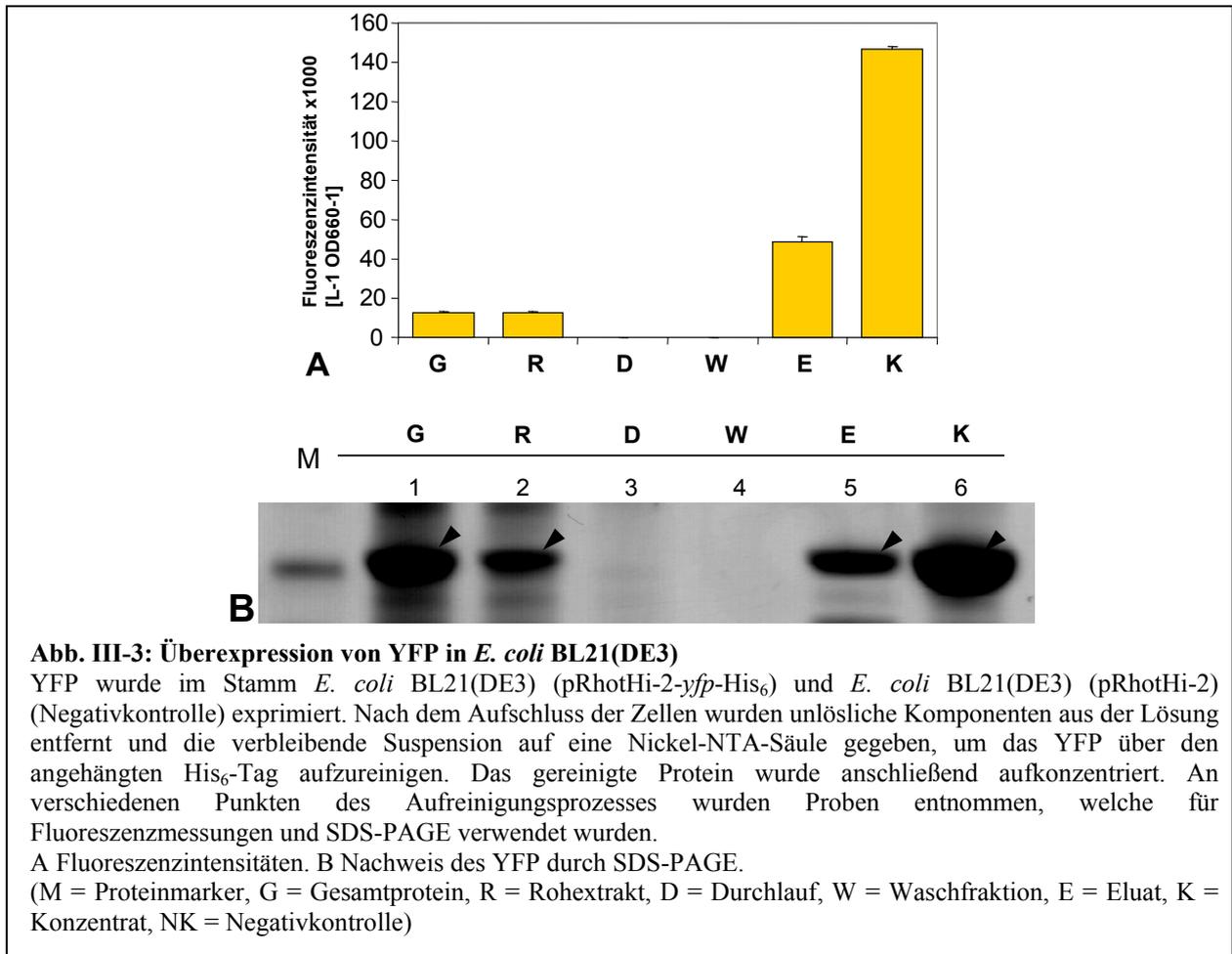
Unter beiden Wachstumsbedingungen akkumulierte im Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 (pRhotHi-2-*yfp*-His<sub>6</sub>) das Protein YFP in so großen Mengen, dass das lösliche Protein als Bande bei der erwarteten Größe von 27 kDa deutlich zu erkennen war (Abb. III-2 C). Diese Bande lag in den korrespondierenden Negativkontrollen mit dem Plasmid pRhotHi-2 (Spuren 7, 14) nicht vor. Beim Vergleich der Intensität der YFP-Bande in Gesamtprotein und Rohextrakt für jede Wachstumsbedingung (Spuren 1 und 2, 8 und 9), konnte kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass YFP ausschließlich als lösliches Protein in den Zellen vorliegt, da offenbar keine Verringerung der YFP-Ausbeute durch die Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen aus dem Gesamtprotein eintritt. Da eine Aggregation in „inclusion bodies“ meist durch falsche Faltung ausgelöst wird, bedeutet eine Akkumulation in den löslichen Fraktionen, dass YFP offenbar korrekt gefaltet wurde und daher funktionell ist. Im Eluat und im Konzentrat war unter beiden Wachstumsbedingungen eine große Menge YFP nachzuweisen, wobei die Ausbeute in phototroph gewachsenen Kulturen (Spuren 5, 6) deutlich höher war als die Ausbeute in aerob gewachsenen Kulturen (Spuren 6, 13). Vergleicht man die Intensität der YFP-Banden in Proben phototropher (Spuren 1, 2) und aerober Kulturen (Spuren 7, 8), zeigte sich dass unter phototrophen Wachstumsbedingungen eine höhere Ausbeute des Proteins erzielt wurde.



Durch Quantifizierung des aufgereinigten YFP wurde ermittelt, dass unter aeroben Bedingungen eine Gesamtausbeute von 30,29 mg pro Liter *R. capsulatus* Kultur, normalisiert auf eine OD<sub>660</sub> von 1, erzielt wurde. In phototropen Kulturen akkumulierte YFP mit einer Ausbeute von 80,26 mg L<sup>-1</sup> OD<sub>660</sub><sup>-1</sup>.

Die Expressionseffizienz, die mit dem neuen *R. capsulatus* T7-System erreicht wurde, sollte nun mit der Effizienz des Stammes *E. coli* BL21(DE3) verglichen werden. Dies sollte zeigen, wie hoch die Proteinausbeute in *R. capsulatus* B10S-T7 im Vergleich zu einem etablierten Expressionswirt ist. Das Ergebnis der Überexpression von YFP in diesem Stamm ist in Abb. III-3 dargestellt.

In Abb. III-3 A konnte sowohl vor der Aufreinigung (Gesamtprotein, Rohextrakt) als auch nach der Aufreinigung (Eluat, Konzentrat) aktives YFP in den Proben nachgewiesen werden. Im Konzentrat konnte schließlich eine Fluoreszenzintensität von 146.363 (± 1.773) Fluoreszenzeinheiten pro Liter Kultur einer OD<sub>580</sub> von 1 festgestellt werden.



Die Akkumulation des Proteins im SDS-Gel zeigt Abb. III-3 B. Die Bande des YFP bei 25 kDa ist in Proben des Gesamtproteins (Spur 1), des Rohextraktes (Spur 2), des Eluats (Spur 5) und des Konzentrats (Spur 6) gut zu erkennen. Die Intensität der YFP-Bande im Rohextrakt ist gegenüber der Intensität der Bande im Gesamtprotein verringert. Das bedeutet, dass offenbar ein Teil des heterologen YFP in *E. coli* in nicht löslicher Form aggregierte und daher offenbar größere Mengen inaktiven Proteins produziert wurden als in *R. capsulatus*. Im Eluat (Spur 5) traten neben einer starken Bande aufgereinigten YFP allerdings noch weitere, schwächere Banden auf. Solche Banden wurden in *R. capsulatus* nicht beobachtet. Offenbar wurden weitere Proteine aufgrund von unspezifischen Bindungen an die zur Aufreinigung verwendete Säule mitpräzipitiert und verunreinigen nun die Probe. Dies deutet darauf hin dass *E. coli* BL21(DE3) mehr Proteine mit solchen Sequenzen enthält als *R. capsulatus* und würde einen Vorteil für *Rhodobacter* als Expressionswirt für heterologe Proteine bedeuten, wenn diese über eine solche Säule aufgereinigt werden sollen.

Die Quantifizierung der YFP-Ausbeute ergab, dass 95,5 mg des Reporterproteins pro Liter Kultur mit einer OD<sub>580</sub> von 1 isoliert werden konnten.

Das Reporterprotein YFP konnte sowohl in *R. capsulatus* als auch in *E. coli* sehr effizient durch T7-abhängige Expression akkumuliert werden. Aus dem Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 konnte nach T7-abhängiger Expression unter aeroben Bedingungen 30,30 mg YFP aus den Kulturen isoliert werden, unter phototrophen Bedingungen 80,27 mg. Damit war die Ausbeute unter phototrophen Bedingungen fast ebenso hoch wie in dem *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3), in welchem die Ausbeute des YFP 95,22 mg betrug.

### 1.3 Untersuchungen proteasedefizienter Stämme von *R. capsulatus*

Mit dem Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 wurde ein leistungsstarkes T7-Expressionssystem erzeugt. Zur weiteren Verbesserung der Proteinausbeuten in *R. capsulatus* sollte nun der Effekt der Deletion von Proteasen auf die Ausbeute eines heterolog exprimierten Proteins in diesem Wirtsorganismus untersucht werden.

Die Aktivität der wirtseigenen Proteasen kann bei der heterologen Überexpression von Proteinen ein Problem darstellen, da durch sie die Ausbeute des heterologen Proteins reduziert werden kann (Kap. I-2.1). In anderen bakteriellen Expressionswirten konnte die Proteinausbeute erhöht werden, wenn die wirtseigenen Proteasen deletiert wurden. Auch für *R. capsulatus* wurden Proteasegene identifiziert und anschließend deletiert (Kreuz, 2003). Es wurden durch Sequenzvergleiche mit bekannten Proteasen mehrere Gene identifiziert, die für Untereinheiten der putativen *R. capsulatus* Proteasekomplexe ClpXP und HslUV sowie die putative Protease Lon kodieren. Mittels sequenzspezifischer Insertionsmutagenese konnten diese Gene deletiert und so proteasedefiziente Stämme von *R. capsulatus* erzeugt werden. Die Deletion der Gene erfolgte durch Insertionskassetten, die in zwei verschiedenen Orientierungen in die Sequenz des Zielgens inseriert wurden. In den Stämmen mit den Mutationen  $\Delta clpP_a$ ,  $\Delta hslV_a$  und  $\Delta lon_a$  war die Insertionskassette so orientiert, dass nachfolgende Gene des betroffenen Operons weiterhin abgelesen werden konnten (apolare Mutation). In den Stämmen mit den Mutationen  $\Delta clpP_p$ ,  $\Delta hslV_p$  und  $\Delta lon_p$  dagegen war die Transkription der nachfolgenden Gene nicht mehr möglich (polare Mutation), was die Zellen und damit die heterologe Expression negativ beeinflussen kann.

Die proteasedefizienten Expressionsstämme, im Folgenden als *R. capsulatus* B10S- $\Delta clpP_a$ , B10S- $\Delta clpP_p$ , B10S- $\Delta hslV_a$ , B10S- $\Delta hslV_p$ , B10S- $\Delta lon_a$  und B10S- $\Delta lon_p$  bezeichnet, sollten nun in der vorliegenden Arbeit auf ihren Effekt auf die heterologe Expression des

Reporterproteins YFP hin untersucht werden. Dazu wurde die Akkumulation dieses Proteins in den Wirtszellen über mehrere Tage beobachtet.

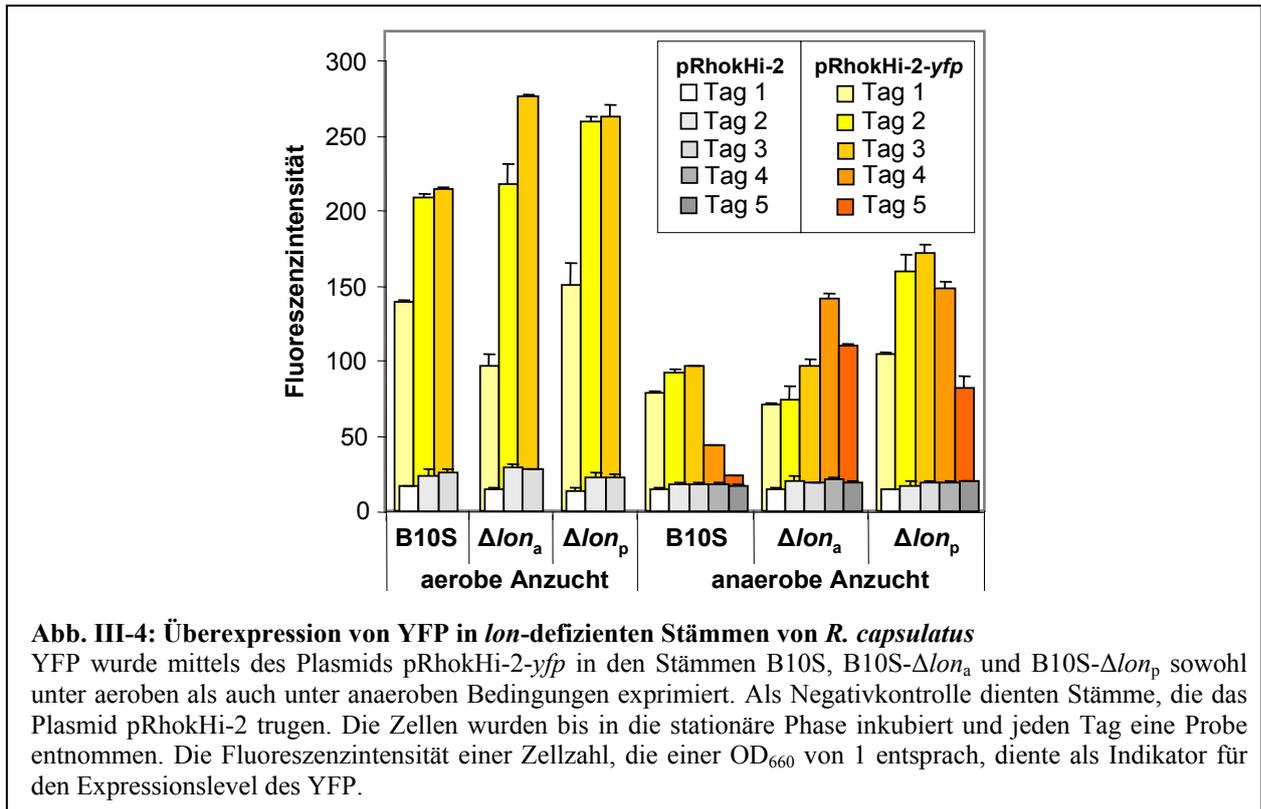
### **1.3.1 Expression von YFP in *lon*-defizienten Stämmen von *R. capsulatus***

Die Protease Lon ist eine ATP-abhängige Protease, welche in vielen Organismengruppen weit verbreitet ist (Kap. I-2.1). In *E. coli* ist sie am Abbau vieler cytoplasmatischer Proteine beteiligt. Auch in *R. capsulatus* konnte ein *lon*-homologes Gen identifiziert und schließlich deletiert werden (Kreuz, 2003).

Zur Expression von YFP in den *lon*-Mutantenstämmen B10S- $\Delta lon_a$  und B10S- $\Delta lon_p$  wurden sowohl das Expressionsplasmid pRhokHi-2-*yfp* als auch das Kontrollplasmid pRhokHi-2 durch Konjugation in die Stämme übertragen. Dieses Plasmid erlaubt die konstitutive Überexpression der klonierten Gene. Eine T7-abhängige Expression konnte in diesen Versuchen nicht durchgeführt werden, da die proteasedefizienten Stämme auf dem Wildtyp *R. capsulatus* B10S, nicht auf dem T7-Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 beruhen. Zudem wurden die genannten Plasmide für einen Vergleich mit dem Wildtypstamm auch in *R. capsulatus* B10S eingebracht. In allen Expressionsstämmen wurde jeweils in Dreifachbestimmung die Expression sowohl unter aeroben Bedingungen als auch unter anaeroben Bedingungen analysiert. Die Anzucht erfolgte über mehrere Tage. Es wurden täglich aus den Kulturen Proben entnommen und für Fluoreszenzmessungen verwendet (Kap. II-13.1). Anhand der Fluoreszenzmessungen wurde die zeitabhängige Entwicklung der Expression des YFP über den Zeitraum der Untersuchungen in den verwendeten Stämmen beobachtet.

In Abb. III-4 ist gezeigt, welchen Effekt die Deletion des Gens *lon* auf die Überexpression des Fluoreszenzreporterproteins YFP in *R. capsulatus* hat.

Die Fluoreszenzmessungen der Negativkontrollen (graue Balken) zeigen, dass nur eine minimale Fluoreszenzintensität erreicht wurde, wenn die Zellen das Plasmid pRhokHi-2, nicht aber das Plasmid pRhokHi-2-*yfp* enthielten. Das belegt, dass die in den Expressionskulturen mit dem Plasmid pRhokHi-2-*yfp* beobachtete erhöhte Fluoreszenz nur durch YFP verursacht wird.



Unter anaeroben Wachstumsbedingungen erreichte der Wildtyp-Stamm B10S ebenfalls nach drei Tagen die maximale Fluoreszenzintensität mit 96,31 ( $\pm$  0,26) Einheiten. Am vierten Tag der Expression war eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Dies deutet auf einen raschen Abbau des YFP hin.

Der Stamm B10S- $\Delta lon_a$  zeigte unter phototrophen Wachstumsbedingungen in den ersten drei Tagen ein ähnliches Expressionsmuster wie der Wildtyp. Bemerkenswerter Weise war in B10S- $\Delta lon_a$  über diesen Zeitpunkt hinaus keine Reduktion der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen wie es in B10S beobachtet wurde. Stattdessen stieg die Fluoreszenzintensität weiter, bis mit 141,19 ( $\pm$  3,57) Fluoreszenzeinheiten für diesen Stamm die höchste Intensität erreicht wurde (Tag 4). Erst an Tag 5 wurde mit 110,39 ( $\pm$  0,75) Fluoreszenzeinheiten eine Reduktion der YFP-Fluoreszenz beobachtet. Damit konnte in dem Mutantenstamm B10S- $\Delta lon_a$  eine um etwa 46% höhere YFP-Akkumulation erreicht werden als im Wildtypstamm B10S. Bemerkenswert war, dass dieses Maximum zu einem Zeitpunkt erreicht wurde, an dem im Wildtyp-Stamm B10S bereits eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität zu beobachten war.

In dem Expressionsstamm B10S- $\Delta lon_p$  konnte wiederum bereits am ersten Tag der Expression eine gegenüber den entsprechenden Werten von B10S erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen werden. Das Maximum erreichte dieser Stamm am dritten

Tag der Expression mit einer Fluoreszenzintensität von 171,68 ( $\pm$  5,42) Einheiten. Das entspricht einer Verbesserung der Ausbeute um 78% gegenüber dem Wildtypstamm. Ab dem vierten Tag der Expression wurde wie in B10S eine Verringerung der Fluoreszenzintensität gemessen.

Vergleicht man die maximal erzielten Fluoreszenzintensitäten in den Stämmen B10S- $\Delta lon_a$  und B10S- $\Delta lon_p$ , so konnten unter aeroben Bedingungen in beiden Stämmen nahezu identische Werte erreicht werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Akkumulation des YFP im Stamm B10S- $\Delta lon_a$  langsamer vonstatten ging als im Stamm B10S- $\Delta lon_p$  oder auch im Wildtyp-Stamm B10S. Diese verlangsamte Akkumulation war im Stamm mit der  $\Delta lon_p$ -Mutation nicht zu beobachten.

### 1.3.2 Expression von YFP in *hslV*-defizienten Stämmen von *R. capsulatus*

Bei der Protease HslUV handelt es sich ebenfalls um eine ATP-abhängige Protease. Sie wird vor allem exprimiert, wenn die Zellen auf einen Hitzeschock reagieren (Kap. I-2.1). Diese Protease besteht aus den zwei Untereinheiten HslU und HslV. In *R. capsulatus* konnte ein Gen identifiziert werden, welches hohe Übereinstimmungen mit der Sequenz des *E. coli hslV*-Gens aufweist (Kreuz, 2003). Dieses Gen wurde in dem *R. capsulatus* Stamm B10S deletiert, um die proteasedefizienten Stämme B10S- $\Delta hslV_a$  und B10S- $\Delta hslV_p$  zu erzeugen.

Für die Untersuchungen zur Wirkung der Deletion des Gens *hslV* auf die Expressionsleistung von *R. capsulatus* wurde ebenso vorgegangen wie bei den Experimenten zur Expression von YFP in *lon*-defizienten *R. capsulatus* Stämmen (Kap. III-1.3.1). Es wurden allerdings in diesem Fall die Plasmide pRhokHi-6-*yfp* und pRhokHi-6 anstelle von pRhokHi-2-*yfp* und pRhokHi-2 als Expressionsplasmide verwendet, da die Deletion des *hslV*-Gens durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette erfolgt war. Daher musste zur Selektion von Stämmen mit den Expressionsplasmiden ein Plasmid mit einer alternativen Antibiotikaresistenz (Spectinomycin) verwendet werden.

Die Expression von YFP in den Stämmen B10S, B10S- $\Delta hslV_a$  und B10S- $\Delta hslV_p$  ist in Abb. III-5 gezeigt. Unter aeroben Bedingungen konnte im Kontrollstamm B10S nach zwei Tagen eine Fluoreszenz von 252,02 ( $\pm$  28,02) Fluoreszenzeinheiten gemessen werden. Am nächsten Tag erfolgte dagegen eine deutliche Reduktion in der Fluoreszenzintensität. Die Expression von YFP in den Stämmen B10S- $\Delta hslV_a$  und B10S- $\Delta hslV_p$  führte zu einem ähnlichen Muster in der Entwicklung der Fluoreszenzaktivität. Die Fluoreszenzintensitäten unterschieden sich

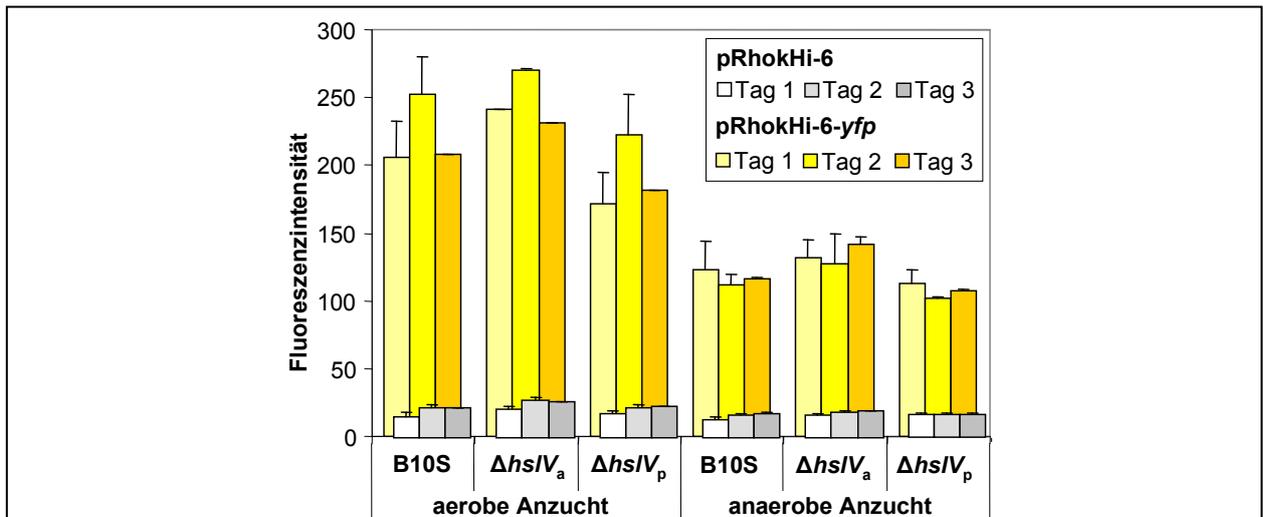
allerdings von den entsprechenden Messungen in B10S. Die maximale Fluoreszenzintensität in dem Stamm mit der Mutation  $\Delta lon_a$  betrug 269,96 ( $\pm 22,69$ ) Einheiten (Tag 2) und entsprach damit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität um etwa 7%. In dem Stamm mit der Mutation  $\Delta hslV_p$  dagegen war die maximale Fluoreszenzintensität um 13% gegenüber dem Wildtypstamm B10S und um 21% gegenüber dem Stamm B10S- $\Delta hslV_a$  erniedrigt.

Unter anaeroben Bedingungen konnte im Stamm B10S (pRhokHi-6-*yfp*) in dieser Expressionsreihe am ersten Tag der Expression die höchste Fluoreszenzintensität gemessen werden mit 123,01 ( $\pm 20,95$ ) Fluoreszenzeinheiten. Danach veränderte sich die gemessene Fluoreszenzintensität nur unwesentlich. Der proteasedefiziente Stamm B10S- $\Delta hslV_a$  zeigte an allen Tagen jeweils höhere Fluoreszenzen als B10S und erreichte drei Tage nach Beginn der Expression die höchste Fluoreszenzintensität mit 141,26 ( $\pm 6,29$ ) Einheiten. Dies entsprach einer Erhöhung um 15% gegenüber der höchsten gemessenen Fluoreszenzintensität B10S (pRhokHi-6-*yfp*). Die Expression von YFP im Stamm B10S- $\Delta hslV_p$  führte dagegen auch unter phototrophen Wachstumsbedingungen zu verringerten Fluoreszenzintensitäten gegenüber der Expression im Wildtypstamm. Die maximale Fluoreszenzintensität betrug 112,65 ( $\pm 9,81$ ) Einheiten und war damit um ca. 8% gegenüber dem Wildtypstamm vermindert.

Im Gegensatz zu der starken Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten, die in den Stämmen mit defekter Lon-Protease beobachtet wurden (Kap. III-1.3.1) führte die Deletion des Gens *hslV* nur zu geringen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp-Stamm B10S. Die Inaktivierung des Gens *hslV* durch eine polare Mutation führte sogar zu verminderten Ausbeuten des heterologen YFP.

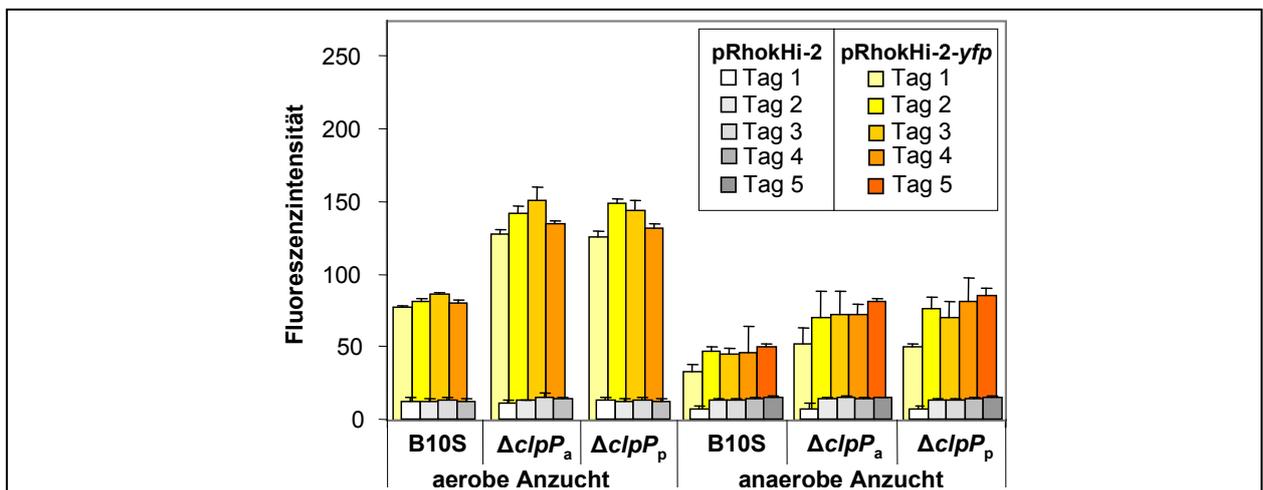
### 1.3.3 Expression von YFP in *clpP*-defizienten Stämmen von *R. capsulatus*

Die Protease ClpXP ist eine weitere aus zwei Untereinheiten bestehende Protease (Kap. I-2.1). Dieser Enzymkomplex ist in der Lage, ohne die Zufuhr von Energie kleine Proteine zu spalten sowie unter ATP-Verbrauch größere Proteine. Zudem besitzt dieses Enzym eine Chaperonaktivität. In *R. capsulatus* konnte ein Gen, welches große Homologien zu dem Gen für die ClpP-Untereinheit aufweist, identifiziert werden. Durch die Deletion dieses Gens (Kreuz, 2003) in *R. capsulatus* B10S konnten die proteasedefizienten Stämme B10S- $\Delta clpP_a$  und B10S- $\Delta clpP_p$  konstruiert werden. Auch in diesen Stämmen sollte nun der Effekt der Deletion auf die Expression des heterologen Proteins YFP hin untersucht werden.



**Abb. III-5: Überexpression von YFP in *hsIV*-defizienten Stämmen von *R. capsulatus***

YFP wurde in den Stämmen B10S (pRhokHi-2-yfp), B10S- $\Delta hsIV_a$  (pRhokHi-2-yfp) und B10S- $\Delta hsIV_p$  (pRhokHi-2-yfp) unter aeroben und unter phototrophen Bedingungen exprimiert. Kulturen dieser Stämme mit dem leeren Plasmid pRhokHi-2 dienten als Negativkontrolle. Die Inkubation erfolgte bis zur stationären Wachstumsphase. Dabei wurde jeden Tag eine Probe entsprechend einer  $OD_{660}$  von 1 entnommen und für Fluoreszenzmessungen verwendet. Die Fluoreszenzdaten dienen als Indikator für das Expressionslevel des YFP.



**Abb. III-6: Überexpression von YFP in *clpP*-defizienten Stämmen von *R. capsulatus***

Die Stämme B10S (pRhokHi-2-yfp), B10S- $\Delta clpP_a$  (pRhokHi-2-yfp) und B10S- $\Delta clpP_p$  (pRhokHi-2-yfp) wurden zur Expression von YFP sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen verwendet. Kulturen von B10S (pRhokHi-2), B10S- $\Delta clpP_a$  (pRhokHi-2) und B10S- $\Delta clpP_p$  (pRhokHi-2) dienten als Negativkontrollen. Während der Inkubation bis zur stationären Wachstumsphase wurde aus jeder Kultur täglich eine Probe entnommen, deren Zelldichte einer  $OD_{660}$  von 1 in 1 ml entsprach. Mit diesen Proben wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt, deren Ergebnis dazu dienen sollte, das Expressionslevel von YFP zu quantifizieren.

Zur Expression von YFP in den *clpP*-defizienten Expressionsstämmen wurde ebenso vorgegangen wie bei den Untersuchungen zum Effekt der Deletion des Gens *lon* auf die Expression dieses Reporterproteins. In Abb. III-6 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen in *R. capsulatus* B10S, B10S- $\Delta clpP_a$  und B10S- $\Delta clpP_p$  dargestellt.

Unter aeroben Anzuchtbedingungen konnte in dieser Expressionsreihe in dem Stamm B10S (pRhokHi-2-*yfp*) die höchste Fluoreszenzintensität am dritten Tag beobachtet werden, mit 107,62 ( $\pm$  1,01) Fluoreszenzeinheiten. Am vierten Tag dagegen kam es zu einer leichten Reduktion der Fluoreszenzintensität auf 100,35 ( $\pm$  2,08) Einheiten. Sowohl in den Proben aus B10S- $\Delta clpP_a$  (pRhokHi-2-*yfp*) als auch in den Proben aus B10S- $\Delta clpP_p$  (pRhokHi-2-*yfp*) wurden über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich höhere Fluoreszenzintensitäten gemessen als im Wildtypstamm. Ebenfalls bei beiden Stämmen wurde gegen Ende der Messung eine Reduktion der Fluoreszenzaktivität beobachtet. Der Stamm B10S- $\Delta clpP_a$  (pRhokHi-2-*yfp*) erreichte mit einem Maximum von 187,76 ( $\pm$  10,69) Fluoreszenzeinheiten (Tag 3) eine um 74 % verbesserte Ausbeute gegenüber B10S (pRhokHi-2-*yfp*). Im Stamm B10S- $\Delta clpP_p$  (pRhokHi-2-*yfp*) betrug die maximale Fluoreszenzintensität 178,37 ( $\pm$  9,58) Fluoreszenzeinheiten (Tag 2), das bedeutete eine Verbesserung gegenüber der Ausbeute im Stamm B10S von 60%.

Bei anaerober Kultivierung stieg die Fluoreszenz in den Kulturen von B10S (pRhokHi-2-*yfp*) langsam an bis zu einer maximalen Fluoreszenzintensität von 62,97 ( $\pm$  2,62) Einheiten nach fünf Tagen. In den Stämmen mit den Mutationen  $\Delta clpP_a$  und  $\Delta clpP_p$  wurde ebenfalls an Tag 5 die höchsten Fluoreszenzintensitäten gemessen mit 100,63 ( $\pm$  2,57) Fluoreszenzeinheiten für den Stamm B10S- $\Delta clpP_a$  (pRhokHi-2-*yfp*) und 105,80 ( $\pm$  7,30) Einheiten im Stamm B10S- $\Delta clpP_p$  (pRhokHi-2-*yfp*). Das entsprach einer um 60% bzw. 68% höheren Fluoreszenzintensität des heterolog exprimierten YFP in den *clpP*-defizienten Stämmen gegenüber dem Wildtypstamm B10S.

Durch die Deletion der Protease-Gene *lon*, *hslV* und *clpP* konnte in YFP-exprimierenden Stämmen eine gegenüber dem Wildtypstamm erhöhte Fluoreszenzintensität des Reporterproteins erzielt werden. Das deutet auf eine verstärkte Akkumulation des Reporterproteins durch verringerte Proteaseaktivität hin.

Die Mutation  $\Delta lon_a$  bewirkte eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um 29% unter aeroben und 46% unter anaeroben Wachstumsbedingungen, in dem Stamm B10S- $\Delta lon_p$  waren es 23% und 78%. In beiden *lon*-defizienten Stämmen wurde YFP unter anaeroben Bedingungen

weiter akkumuliert, als in B10S bereits ein starker Abbau einsetzte. Dieser Effekt wurde nur in diesen Stämmen beobachtet, nicht in den Stämmen mit Deletionen in den Genen *hsIV* oder *clpP*.

Durch die Deletion des Gens *hsIV* mittels apolarer Mutation ( $\Delta hsIV_a$ ) konnte nur eine schwache Erhöhung der Fluoreszenzintensität um 7% unter aeroben und um 22% unter anaeroben Expressionsbedingungen erzielt werden. Die Deletion des Gens mittels polarer Mutation ( $\Delta hsIV_p$ ) führte dagegen unter beiden Wachstumsbedingungen zu einer Verringerung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten.

In den *clpP*-defizienten Stämmen B10S- $\Delta clpP_a$  und B10S- $\Delta clpP_p$  waren die Fluoreszenzintensitäten unter aeroben Bedingungen um 74% für  $\Delta clpP_a$  und um 60% für  $\Delta clpP_p$  gegenüber dem Wildtypstamm B10S erhöht. Unter anaeroben Bedingungen betrug die Erhöhung 60% für  $\Delta clpP_a$  und 68% für  $\Delta clpP_p$ .

## **2 Modifikation der Zusammensetzung der bakteriellen Membran von *R. capsulatus***

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der heterologen Expression von Fettsäure-Desaturasen als Vertreter der Gruppe der Fettsäure-modifizierenden Enzyme (Kap. I-1.3).

Fettsäure-Desaturasen fügen eine Doppelbindung in die Acylketten der Fettsäuren in den Phospholipiden der Membran ein. Leider enthalten bakterielle Membranen nur eine begrenzte Anzahl verschiedener Fettsäuren und begrenzen so die Zahl möglicher *in vivo* Umsetzungen. Um das Substratspektrum zu erweitern, ist es notwendig organismusfremde Fettsäuren in die Membran des bakteriellen Wirts zu integrieren.

Es ist bekannt, dass einige Bakterien in der Lage sind, Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufzunehmen und in Phospholipide einzubauen (Kap. I-1.4). Vor den Experimenten zur Expression von Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* sollte daher untersucht werden, ob es auch in diesem Organismus möglich ist, die Zusammensetzung der bakteriellen Membran durch den Einbau exogener Fettsäuren zu modifizieren.

### **2.1 Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus***

Für die Umsetzung von membrangebundenen Fettsäuren durch heterolog exprimierte Fettsäure-Desaturasen sollten wirtsfremde Fettsäuren als Substrate in die bakterielle Membran

von *R. capsulatus* eingefügt werden. Dazu sollte dieses Bakterium in der Gegenwart von Fettsäuren im Kulturmedium angezogen werden, so dass die Fettsäuren durch die Bakterienzellen aufgenommen und in die Membran eingebaut werden konnten. Dabei wurde eine möglichst hohe Integrationseffizienz angestrebt, um eine optimale Versorgung der heterologen Enzyme mit dem Substrat zu gewährleisten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zunächst eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um die Effizienz der Aufnahme der exogenen Fettsäuren aus dem Kulturmedium und ihres Einbaus in die Membran zu optimieren. Nach der Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Assimilation von Fettsäuren aus dem Kulturmedium sollte *R. capsulatus* in Gegenwart verschiedener exogener Fettsäuren kultiviert werden, um zu untersuchen mit welcher Effizienz sich unterschiedliche Fettsäuren in die bakterielle Membran integrieren lassen.

### 2.1.1 Die natürliche Membranzusammensetzung von *R. capsulatus*

Bei den meisten der Versuche zur Modifikation der Zusammensetzung der bakteriellen Membran von *R. capsulatus* sollten die Veränderungen in der Membran des Wirtsorganismus durch den Nachweis der modifizierten Fettsäuren in der Membran durch gaschromatographische Analyse erfolgen. Zu Vergleichszwecken sollte daher zunächst die natürliche Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* analysiert werden.

**Tab. III-1: Ausbeuten der Fettsäuremethylester aus natürlichen Membranen von *R. capsulatus* B10S-T7.** Standardabweichungen in Klammern. (Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

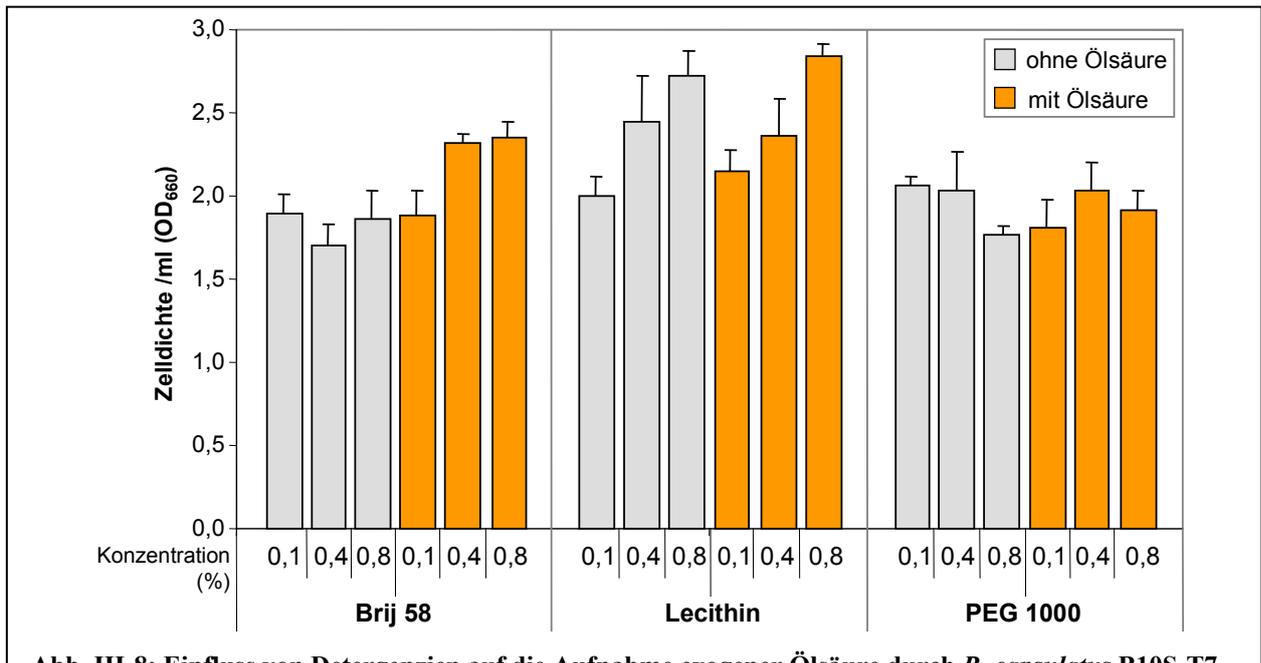
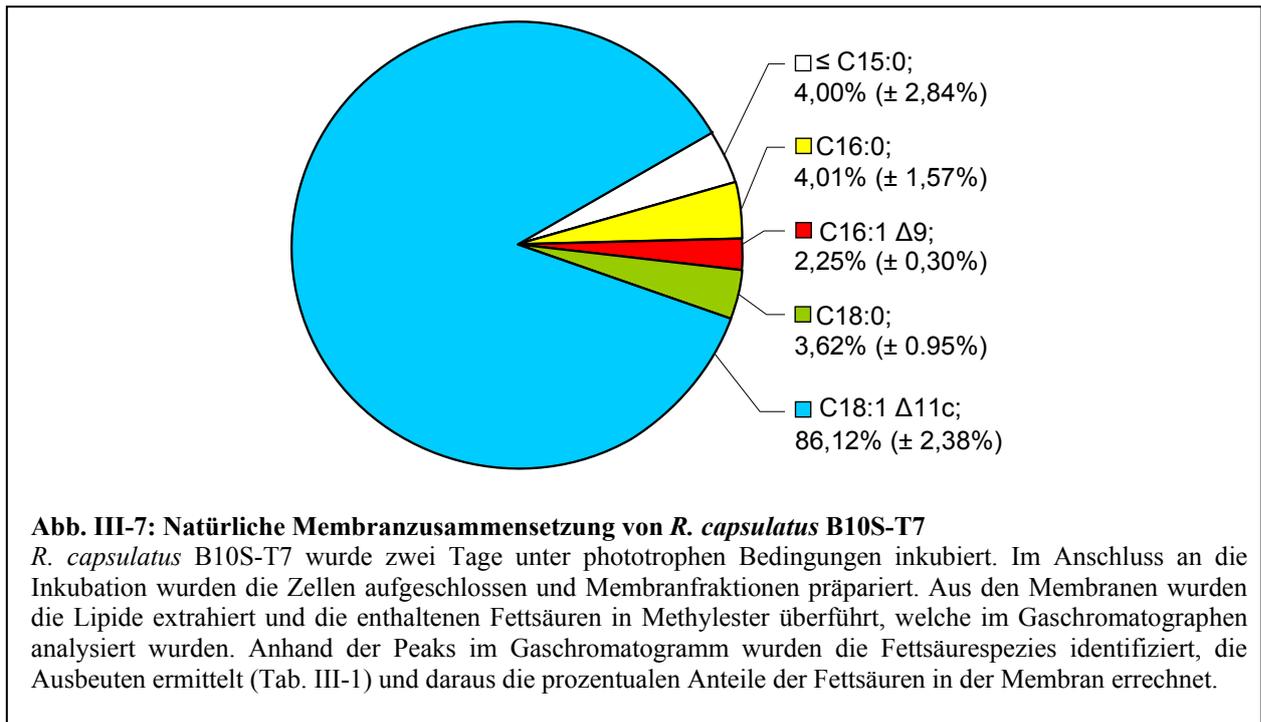
| Komponente                | B10S-T7   |  |
|---------------------------|---|--|
|                           | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
| $\leq \text{C15:0}$       | 0,12 ( $\pm 0,09$ )                                   | 0,20 ( $\pm 0,14$ )                                    |
| C16:0                     | 0,12 ( $\pm 0,06$ )                                   | 0,20 ( $\pm 0,08$ )                                    |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,11 ( $\pm 0,04$ )                                   | 0,18 ( $\pm 0,05$ )                                    |
| C18:0                     | 0,07 ( $\pm 0,01$ )                                   | 0,11 ( $\pm 0,01$ )                                    |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 2,60 ( $\pm 0,14$ )                                   | 4,31 ( $\pm 0,12$ )                                    |
| Gesamtausbeute            | 3,02 ( $\pm 0,24$ )                                   | 5,00 ( $\pm 0,40$ )                                    |

Um die natürliche Zusammensetzung dieses Organismus zu untersuchen wurden in Dreifachbestimmung Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 mit einer OD von 0,02 in 100ml RCV Minimalmedium angesetzt (Kap. II-4.3) und unter phototrophen Bedingungen für zwei Tage inkubiert (Kap. II-10.1.2). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit der French Press aufgeschlossen (Kap. II-10.5) und die Membranfraktionen isoliert (Kap. II-10.6). Aus den Membranfraktionen wurden die Lipide extrahiert und die darin enthaltenen Fettsäuren in Methylester überführt, um Proben für die Gaschromatographie zu gewinnen (Kap. II-13.2). Nach der Analyse der Proben im Gaschromatographen wurden die verschiedenen Fettsäuren im Chromatogramm anhand der Retentionszeit der einzelnen Peaks im Vergleich zu einem externen Standard (Kap. II-7) identifiziert und die absoluten Ausbeuten der einzelnen Fettsäuremethylester aus der Fläche jedes Peaks und der Fläche des internen Standards Methylheptadekanoat errechnet. Da die absoluten Ausbeuten aufarbeitungsbedingt starken Schwankungen zwischen den Proben unterworfen waren, wurden sie auf eine Gesamtausbeute der Fettsäuremethylester von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$  umgerechnet, um relative Ausbeuten zu erhalten. Aus diesen wurde zusätzlich der prozentuale Anteil jeder Fettsäure an den Gesamtfettsäuren errechnet.

In Tab. III-1 sind die absoluten und relativen Ausbeuten der Fettsäurespezies der *R. capsulatus* Membran aufgetragen. Die prozentualen Anteile der Fettsäuren in der natürlichen Zusammensetzung der Membran sind in Abb. III-7 dargestellt.

Die Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 besteht zum überwiegenden Teil aus *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Fläche) mit einem prozentualen Anteil an den Fettsäuren der Membran von 86,12% ( $\pm$  2,38%). Eine zweite ungesättigte Fettsäure, Palmitoleinsäure (C16:1  $\Delta$ 9, rote Fläche), nahm einen Anteil von 2,25% ( $\pm$  0,30%) der Gesamtfettsäuren ein. Die weiteren Bestandteile sind die gesättigten Säuren Stearinsäure (C18:0, grüne Fläche) sowie Palmitinsäure (C16:0, gelbe Fläche), die jeweils einen Membrananteil von etwa 4% erreichten.

Der Rest der Membran umfasste eine Reihe kurzkettiger Fettsäurederivate ( $\leq$  C15:0, weiße Fläche). Die Peaks dieser Komponenten lagen nahe den Positionen, die man anhand des externen Standards für die Fettsäuren C11:0, C13:0 und C15:0 erwarten würde, wiesen aber eine Abweichung in ihren Retentionszeiten auf, durch welche sie nicht eindeutig zu identifizieren waren. Möglicherweise handelt es sich um Derivate kurzkettiger Fettsäuren mit speziellen funktionellen Gruppen, welche eine Abweichung der Retentionszeiten herbeiführen. Ebenso ist es möglich, dass es sich um Vorstufen der Fettsäure-Biosynthese oder Abbauprodukte von Fettsäuren handelt.



**Abb. III-8: Einfluss von Detergenzien auf die Aufnahme exogener Ölsäure durch *R. capsulatus* B10S-T7**  
*R. capsulatus* B10S-T7 wurde in Gegenwart eines der Detergenzien Brij 58, Lecithin oder PEG 1000 in Endkonzentrationen von 0,1 bis 0,8% über zwei Tage unter phototrophen Bedingungen angezogen. Es wurden sowohl Kulturen ohne Ölsäure im Medium untersucht als auch Kulturen, die 75µg Ölsäure pro ml Kulturvolumen enthielten. Anhand der OD<sub>660</sub> am Ende der Inkubationszeit wurde das Wachstum der Kulturen verglichen. Das Wachstum sollte als Indikator dienen, ob die Detergenzien die Aufnahme von Ölsäure verbessern.

### **2.1.2 Optimierung der Aufnahme exogener Fettsäuren durch *R. capsulatus***

In den späteren Experimenten zur heterologen Expression von Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* sollte auch die *in vivo* Umsetzung der in der bakteriellen Membran gebundenen Fettsäuren untersucht werden. Um den Enzymen für diese Umsetzungen eine möglichst große Menge Substrat zur Verfügung zu stellen, sollten wirtsfremde Fettsäuren durch Aufnahme aus dem Kulturmedium in die bakterielle Membran integriert werden. Dazu sollten zunächst durch Untersuchung mehrerer Faktoren, die möglicherweise die Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren beeinflussen, die optimalen Bedingungen für die Aufnahme exogener Fettsäuren bestimmt werden.

Ein mögliches Problem bei der Aufnahme von lipophilen Verbindungen wie Fettsäuren aus dem Kulturmedium besteht darin, dass diese Verbindungen sich nur schlecht im wässrigen Kulturmedium lösen und verteilen lassen. Das erschwert den Kontakt zwischen den Fettsäuren und Zellen und kann dadurch zu einer verringerten Aufnahme der Fettsäuren führen. Es sollten zwei Ansätze untersucht werden, um dieses Problem zu mindern: der Einsatz von Detergenzien, um die Löslichkeit supplementierter freier Fettsäuren zu erhöhen, sowie die Zugabe der supplementierten Fettsäuren zum Medium in verschiedenen Derivaten mit unterschiedlicher Löslichkeit.

Der Einbau exogener Fettsäuren in die Membran von *R. capsulatus* wird möglicherweise auch dadurch beschränkt, dass dieses Bakterium von Natur aus bereits einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran enthält, insbesondere *cis*-Vaccensäure. Diese endogene Fettsäure konkurriert möglicherweise mit exogenen Fettsäuren um den Einbau in die Membran. Um den Einbau wirtsfremder Fettsäuren in die Phospholipide der Membran zu verbessern, sollte die Wirkung des Antibiotikums Cerulenin untersucht werden. Dieses Antibiotikum inhibiert die *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren in Bakterien. Der Einsatz von Cerulenin in den Kulturen sollte die zelleigene Produktion von *cis*-Vaccensäure unterbinden und so den Konkurrenzdruck für die exogenen Fettsäuren mindern.

#### **2.1.2.1 Einfluss von Detergenzien auf die Aufnahme ungesättigter Fettsäuren**

Fettsäuren zählen zu den lipophilen Verbindungen und zeichnen sich daher durch hohe Hydrophobizität aus. Dies kann zu Problemen führen, wenn diese Komponenten in wässrigen Medien eingesetzt werden sollen. Die Fettsäuren verteilen sich nur ineffizient im Medium und bilden stattdessen Emulsionen aus Micellenstrukturen oder sammeln sich als Öltropfen an der

Oberfläche des Mediums. Dies begrenzt den Kontakt zwischen den exogenen Fettsäuren und den Zellen auf kleine Regionen, wodurch die Aufnahme der Fettsäuren möglicherweise beeinträchtigt wird. Die Löslichkeit von lipophilen Stoffen kann allerdings durch die Zugabe von Detergenzien ins Medium verbessert werden. Daher sollten drei verschiedene Detergenzien - Brij 58, Lecithin und PEG 1000 - auf ihre Eignung hin untersucht werden, eine maximale Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren zu erzielen. Dabei sollten die Detergenzien auch in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt werden, um festzustellen welche Konzentration zur effizientesten Aufnahme von exogenen Fettsäuren führt.

Die Effizienz der Aufnahme einer Fettsäure aus dem Kulturmedium sollte dabei anhand des Effektes auf das Wachstum gezeigt werden. Da *R. capsulatus* wie viele Bakterien in der Lage ist, Fettsäuren aus dem Medium aufzunehmen und als C-Quelle zu verwerten, wurde erwartet, dass eine verbesserte Zugänglichkeit der Fettsäuren im Medium einen Effekt auf das Wachstum der Zellen herbeiführt. Zusätzlich sollten durch die Experimente überprüft werden, ob sich die Zugabe von Detergenzien ins Medium negativ auf das Wachstum der Zellen auswirkt.

Um die Wirkung der verschiedenen Detergenzien miteinander zu vergleichen, wurde *R. capsulatus* B10S-T7 in 10 ml RCV-Medium (Kap. II-4.3) angezogen, welchem entweder keine Fettsäure zugesetzt wurde (Kontrollen) oder Ölsäure mit einer Konzentration von 75 µg/ml. Sowohl von den Kontrollen als auch von den Ölsäure-supplementierten Kulturen wurden Kulturen angesetzt, welche jeweils eines der drei Detergenzien Brij 58, Lecithin oder PEG 1000 in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Die Kulturen wurden dann für zwei Tage unter phototrophen Bedingungen (Kap. II-10.1.2) inkubiert und anschließend die optische Dichte der Kulturen bei 660 nm bestimmt.

Der Effekt der gewählten Detergenzien auf das Wachstum von *R. capsulatus* B10S-T7 und die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Kulturmedium ist in Abb. III-8 gezeigt.

Kulturen, denen das Detergenz Brij 58, aber keine Ölsäure zugefügt wurde (erster Block, graue Säulen), erreichten eine durchschnittliche optische Dichte bei 660 nm zwischen 1,70 ( $\pm$  0,13) und 1,89 ( $\pm$  0,12). Dies entspricht dem normalen Wachstum von *R. capsulatus* B10S-T7 nach der gewählten Inkubationszeit, und zeigt, dass dieses Detergenz das Zellwachstum nicht behindert. Dieser Effekt scheint von der Konzentration des Brij 58 unabhängig zu sein. Wurden die Kulturen mit Brij 58 und in Gegenwart von Ölsäure im Medium kultiviert (erster Block, orangene Säulen), zeigte sich bei einer Konzentration von 0,1% Brij 58 im Medium kein Unterschied zu den Kontrollkulturen. Diese Konzentration ist offenbar nicht ausreichend, um die Effizienz der Aufnahme von Ölsäure zu erhöhen. In Kulturen mit höheren

Konzentrationen von Brij 58 wurden dagegen um etwa 17% erhöhte Zelldichten beobachtet, was darauf schließen lässt dass die Ölsäure hier wie erwartet leichter zugänglich für die Zellen war. Dabei unterschieden sich die erreichten Zelldichten bei 0,4% Brij 58 und 0,8% Brij 58 nur unwesentlich, das heißt auch mit einer höheren Konzentration als 0,4% lässt sich die Assimilationseffizienz für Ölsäure nicht weiter verbessern.

Die Verwendung von Lecithin als Detergenz führte in den Kontrollkulturen (zweiter Block, graue Säulen) bei einer Konzentration von 0,1% Lecithin zu keiner Veränderung im Wachstum von *R. capsulatus*. In den Kulturen mit höheren Lecithin-Konzentrationen wurden dagegen bedeutend höhere optische Dichten der Kulturen gemessen. Dieser Effekt ist allerdings vermutlich nicht auf ein verstärktes Zellwachstum zurückzuführen, sondern auf die Trübung, die Lecithin in diesen Konzentrationen im Medium verursacht. Wurden Kulturen in Gegenwart von sowohl Lecithin als auch Ölsäure kultiviert, war ebenfalls eine Erhöhung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration zu beobachten (zweiter Block, orangene Säulen). Vergleicht man die Kontrollstämme mit den Ölsäure-supplementierten Kulturen gleicher Lecithin-Konzentration, zeigte sich dass durch die Zugabe der Fettsäure bei allen Detergenzkonzentrationen nur eine unwesentliche Verbesserung des Zellwachstums um etwa 4% erreicht wurde.

Wenn PEG 1000 als Detergenz eingesetzt wurde, zeigte sich in den Kontrollkulturen bei niedrigen PEG 1000-Konzentrationen von 0,1% oder 0,4% kein Effekt auf das Wachstum der Zellen (dritter Block, graue Säulen). In Kulturen mit 0,8% PEG 1000 dagegen war das Zellwachstum deutlich vermindert. Eine ähnliche Reduktion des Wachstums zeigten Kulturen mit PEG 1000, welche mit Ölsäure supplementiert wurden (dritter Block, orangene Säulen). Bei 0,4% PEG 1000 wurde dagegen kein Effekt auf das Wachstum herbeigeführt. Bei einer PEG 1000-Konzentration von 0,8% konnte eine leichte Verbesserung des Zellwachstums gegenüber den entsprechenden Kontrollkulturen beobachtet werden, allerdings unterschied sich die Zelldichte am Ende der Inkubation nur unwesentlich vom Wachstum von *R. capsulatus* B10S-T7 in Gegenwart von PEG 1000 ohne Ölsäure im Medium.

|   |
|---|
| <p>Sowohl die Verwendung von Lecithin als auch PEG 1000 als Detergenz in den Kulturen führte nur zu geringen Veränderungen des bakteriellen Wachstums durch im Medium enthaltene Ölsäure. Die Verwendung von Brij 58 in einer Konzentration von 0,4% bewirkte allerdings in ölsäure-supplementierten Kulturen eine Verbesserung des Wachstums um 17%. Zudem beeinflusste dieses Detergenz im Gegensatz zu den beiden anderen Detergenzien nicht</p> |
|---|

das bakterielle Wachstum oder die Messungen der optischen Dichte. Daher wurde in späteren Versuchen zur Aufnahme von Fettsäuren aus dem Kulturmedium stets 0,4% Brij 58 ins Medium gegeben.

### **2.1.2.2 Effizienz der Aufnahme exogener Fettsäuren als freie Fettsäuren und Fettsäure-Natriumsalz**

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Detergenzien zum Kulturmedium die Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren erhöht. Da der Effekt von Detergenzien darin besteht, die Löslichkeit hydrophober Verbindungen in wässrigem Medium zu verbessern, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Löslichkeit eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium spielt. In weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, ob die Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren weiter erhöht werden kann, indem dem Medium die Fettsäuren als verschiedene Fettsäure-Derivate mit besserer Löslichkeit im wässrigen Medium zugegeben werden. Dazu sollten Ölsäure und Linolsäure sowohl als freie Fettsäure und als Fettsäure-Natriumsalz eingesetzt werden.

Als freie Fettsäuren weisen diese Verbindungen die höchste Hydrophobizität auf. Dadurch können sie sich nicht gleichmäßig im Medium verteilen, sondern bilden Filme auf der Oberfläche des Mediums oder verteilen sich als Tropfen im Medium. Dies beschränkt den Kontakt zwischen Zellen und Fettsäure auf kleine Oberflächen. Fettsäuresalze haben dagegen eine hohe Löslichkeit und verteilen sich daher besser im wässrigen Medium. Der Einsatz von Fettsäuren in dieser Form sollte daher den Kontakt zwischen den Zellen und der aufzunehmenden Fettsäure erleichtern.

Um die Aufnahme der Fettsäure-Derivate in *R. capsulatus* B10S-T7 zu untersuchen, wurde dieses Bakterium in Dreifachbestimmung in 100ml RCV Minimalmedium mit 0,4% Brij 58 angesetzt, welches mit jeweils einem der Derivate der untersuchten Fettsäure in einer Konzentration von 75µg pro ml Kulturmedium versetzt wurde. Als Kontrollen dienten Kulturen ohne Fettsäure im Medium. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt, einmal für Ölsäure und einmal für Linolsäure in den verschiedenen Derivaten. Beide Fettsäuren sind häufige Substrate von Fettsäure-Desaturasen. Die Anzucht erfolgte unter phototrophen Bedingungen. Die anschließenden Präparationen und Berechnungen wurden ebenso

durchgeführt wie für die Untersuchungen zur natürlichen Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 (Kap. III-2.1.1).

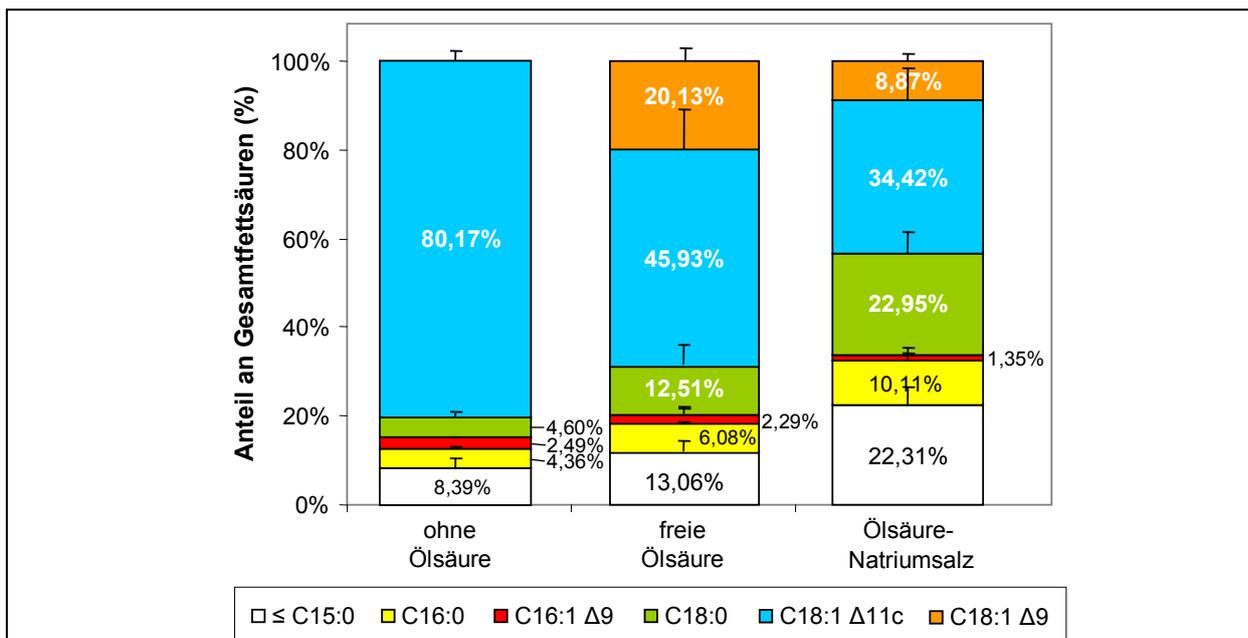
Die Ergebnisse der Untersuchung für die Ölsäurederivate sind in Tab. VII-1 (Anhang) und Abb. III-9 dargestellt.

Die Kulturen, die ohne die Zugabe einer Fettsäure ins Medium kultiviert wurden, zeigten wie erwartet die normale Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* (Kap. III-2.1.1).

Die Gegenwart von Ölsäure im Medium während der Inkubation der Zellen führte bei allen untersuchten Derivaten dazu, dass zusätzlich zu den natürlichen Bestandteilen der Membran auch ein großer Anteil Ölsäure in der Membran nachzuweisen war (C18:1  $\Delta$ 9, orangene Flächen). Diese Fettsäure akkumulierte zu einem Anteil von 20,13% ( $\pm$  4,21%) an den Gesamtfettsäuren, wenn sie als freie Fettsäure zu den Kulturen gegeben wurde und zu 8,87% ( $\pm$  1,59%) bei der Zugabe in der Form eines Natriumsalzes. Die exogene Ölsäure wurde somit sehr effizient durch *R. capsulatus* aus dem Kulturmedium aufgenommen und in die Phospholipide der Membran eingebaut. Die Aufnahmeeffizienz war bei der Verwendung von Ölsäure-Natriumsalz geringer als bei freier Ölsäure.

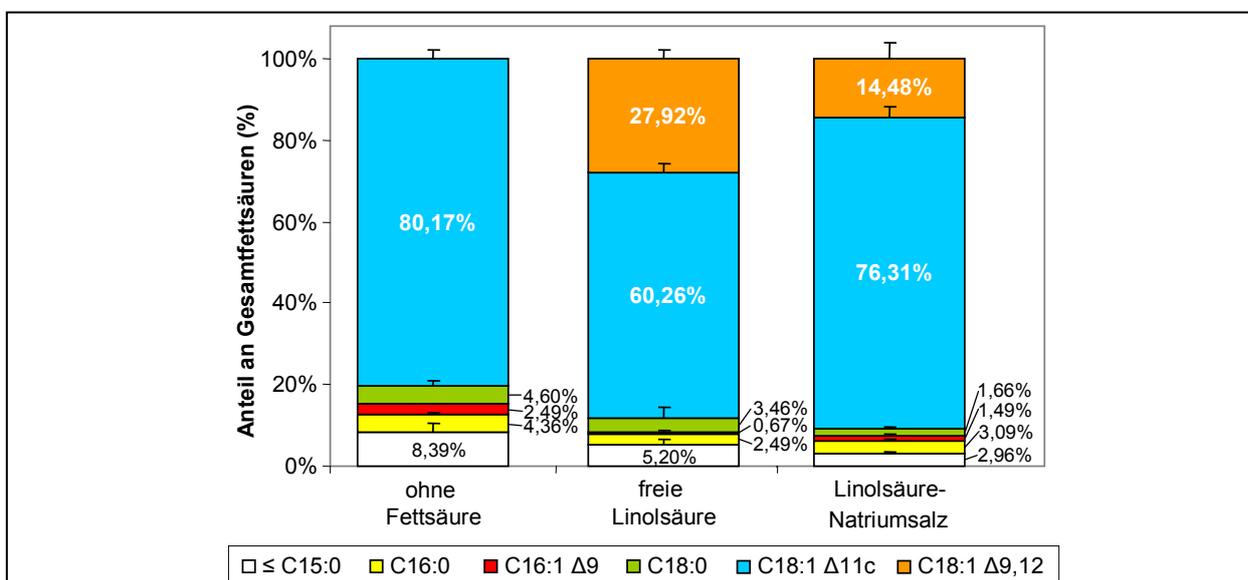
Der Einbau der exogenen Ölsäure in die Membran bewirkte deutliche Veränderungen in den natürlich vorhandenen Fettsäuren der bakteriellen Membran. Die deutlichste Veränderung zeigte der Gehalt der *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, hellblaue Flächen), deren Anteil an der Membran bei der Verwendung von freier Ölsäure um etwa die Hälfte und bei Ölsäure-Natriumsalz um etwa zwei Drittel verringert war. Der Gehalt der Palmitoleinsäure (C16:1  $\Delta$ 9, rote Flächen) blieb dagegen in Zellen aus Kulturen, denen freie Ölsäure oder Ölsäure-Natriumsalz zugegeben wurden, unverändert. Allerdings erhöhten sich die Anteile der gesättigten Fettsäuren Stearinsäure (C18:0, grüne Flächen) und Palmitinsäure (C16:0, gelbe Flächen) sowie der kurzkettigen Bestandteile ( $\leq$  C15:0, weiße Flächen). Bei der Verwendung von freier Ölsäure waren die Anteile der genannten Bestandteile um den Faktor 1,5 bis 3 erhöht, bei der Verwendung von Ölsäure-Natriumsalz betrug der Faktor 3 bis 5.

Die beobachteten Veränderungen der Fettsäuren-Zusammensetzung der Membranen von *R. capsulatus* deuten darauf hin, dass in die Membran integrierte exogene Ölsäure vorwiegend die *cis*-Vaccensäure ersetzt. Diese Substitution ist allerdings nicht vollständig, da der gesamte prozentuale Anteil der ungesättigten Fettsäuren (Palmitoleinsäure, *cis*-Vaccensäure und Ölsäure) nicht dem Anteil der ungesättigten Fettsäuren in der natürlichen Zusammensetzung der *R. capsulatus* Membran entspricht.



**Abb. III-9: Aufnahme verschiedener Ölsäure-Derivate aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus* B10S-T7**

*R. capsulatus* B10S-T7 wurde zwei Tage unter phototropen Bedingungen in Gegenwart verschiedener Ölsäurederivate inkubiert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden durch Fraktionierung Membranfraktionen präpariert, welche zur gaschromatographischen Analyse verwendet wurden. Im Gaschromatogramm wurden die Fettsäure-Bestandteile der Membran anhand eines externen Standards identifiziert. Anhand der Flächen der Peaks und einem internen Standard wurden die Ausbeuten bestimmt. Diese Daten dienen zur Berechnung der Anteile der einzelnen Fettsäuren in der Membran.



**Abb. III-10: Aufnahme verschiedener Linolsäure-Derivate aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus* B10S-T7**

*R. capsulatus* B10S-T7 wurde zwei Tage unter phototropen Bedingungen in Gegenwart verschiedener Linolsäurederivate angezogen. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und Membranfraktionen präpariert. Diese wurden gaschromatographisch analysiert. Die in den Proben enthaltenen Fettsäuren wurden durch den Vergleich der Peaks des Gaschromatogramms mit einem externen Standard identifiziert und anhand der Flächen der Peaks die Ausbeute jeder Fettsäurespezies bestimmt. Aus diesen Daten wurden die Anteile der einzelnen Fettsäuren an der Membranzusammensetzung errechnet.

Die gleichen Untersuchungen wurden mit Linolsäure in verschiedenen Derivaten durchgeführt. Die Ausbeuten der Fettsäurespezies der Membran sind im Anhang (Tab. VII-2) gezeigt, in Abb. III-10 sind die Anteile der verschiedenen Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren dargestellt.

Die Zugabe von Linolsäure (C18:2  $\Delta$ 9,12) zum Kulturmedium führte bei beiden verwendeten Derivaten der Linolsäure zu einem Einbau in die Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 (orangene Flächen). Freie Linolsäure führte zu einem Anteil dieser Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren von 27,92% ( $\pm$  1,97%). Mit einem Anteil von 14,48% ( $\pm$  3,98%) in der Membran wurde Linolsäure deutlich schlechter aufgenommen, wenn diese Fettsäure als Natriumsalz eingesetzt wurde.

Die übrigen Bestandteile der Membranen von *R. capsulatus* B10S-T7 zeigten eine starke Reduktion gegenüber ihren Anteilen in der natürlichen Membranzusammensetzung (Kap. III-2.1.1). Wie es schon für die Ölsäurederivate beobachtet wurde, zeigte sich die stärkste Reduktion im Gehalt der *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, hellblaue Flächen). Das deutet darauf hin, dass in die Membran eingebaute Linolsäure vorwiegend die *cis*-Vaccensäure ersetzt. Die Reduktion der *cis*-Vaccensäure war allerdings weniger prägnant als in den Experimenten zur Aufnahme verschiedener Ölsäure-Derivate. Dies führte auch dazu, dass der Gehalt der ungesättigten Fettsäuren insgesamt fast identisch war zu der natürlichen Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 (Kap. III-2.1.1).

Ein weiterer Unterschied zu den mit Ölsäurederivaten supplementierten Kulturen zeigte sich im Gehalt der gesättigten Fettsäuren (C16:0, gelbe Flächen; C18:0, grüne Flächen) sowie der Palmitoleinsäure (C16:1  $\Delta$ 9, rote Flächen). Die Anteile dieser Fettsäuren waren bei den Versuchen mit Linolsäurederivaten ebenfalls deutlich reduziert.

Sowohl Ölsäure als auch Linolsäure wurden effizient durch *R. capsulatus* B10S-T7 aus dem Kulturmedium aufgenommen und in die Phospholipide der bakteriellen Membran eingebaut. Linolsäure erzielte dabei etwas höhere Anteile an den Membranfraktionen der untersuchten Kulturen als Ölsäure.

Verschiedene Derivate der Fettsäuren wurden mit unterschiedlicher Effizienz aufgenommen. Die höchste Effizienz der Aufnahme wurde bei der Aufnahme als freie Fettsäure erzielt. Daher sollten in nachfolgenden Experimenten die Fettsäuren als freie Fettsäure eingesetzt werden.

### 2.1.2.3 Der Effekt von Cerulenin

Bei der Analyse der Fettsäuren in der Membran von *R. capsulatus* (Kap. III-2.1.1) konnte gezeigt werden, dass die Membran dieses Organismus mit mehr als 80% einen sehr hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren enthält. Das könnte bei der Assimilation von ungesättigten Fettsäuren aus dem Kulturmedium ein limitierender Faktor sein: endogene und exogene ungesättigte Fettsäuren könnten um den Einbau in die Membran konkurrieren und so die Effizienz der Integration fremder Fettsäuren reduzieren.

Daher sollte die Wirkung des Antibiotikums Cerulenin auf *R. capsulatus* untersucht werden. Cerulenin ist ein Inhibitor der *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren (Kap. I-1.2). Durch die Verwendung von Cerulenin sollte es möglich sein, den Anteil endogener ungesättigter Fettsäuren in der Membran zu reduzieren. Wenn der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in der Membran ein limitierender Faktor für die Aufnahme und den Einbau exogener ungesättigter Fettsäuren ist, wäre zu erwarten dass diese Reduktion der endogenen ungesättigten Fettsäuren einen verstärkten Einbau exogener Fettsäuren zur Folge hat. Zusätzlich ist Cerulenin ein Antibiotikum und inhibiert durch die fehlende essentielle Fettsäure das Wachstum der Zellen. Der auf diese Weise entstehende Selektionsdruck kann von den Bakterien nur durch die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Kulturmedium umgangen werden. Auch dies sollte die Effizienz der Aufnahme und des Einbaus exogener Fettsäuren erhöhen.

Daher sollte nun der Effekt des Antibiotikums auf *R. capsulatus* untersucht werden. Durch Inkubation der Zellen in der Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Cerulenin sollten zum einen der Effekt auf das Wachstum der Zellen als auch die durch Cerulenin herbeigeführten Veränderungen in der bakteriellen Membran untersucht werden. Schließlich sollte noch festgestellt werden, welchen Einfluss dieses Antibiotikums auf die Aufnahmeeffizienz für eine exogene Fettsäure hat.

Um den Effekt von Cerulenin auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurde *R. capsulatus* B10S-T7 in Dreifachbestimmung in 15 ml RCV-Medium (Kap. II-4.3) angezogen, welchem verschiedene Konzentrationen von Cerulenin zugesetzt wurden. Kulturen ohne Cerulenin dienten als Kontrollen. Während der zweitägigen Inkubation unter phototrophen Bedingungen (Kap. II-10.1.2) wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben für OD-Messungen entnommen und die Daten zu Wachstumskurven zusammengefasst.

Der Vergleich der Wirkung verschiedener Cerulenin-Konzentrationen auf das Wachstum von *R. capsulatus* ist in Abb. III-11 gezeigt.

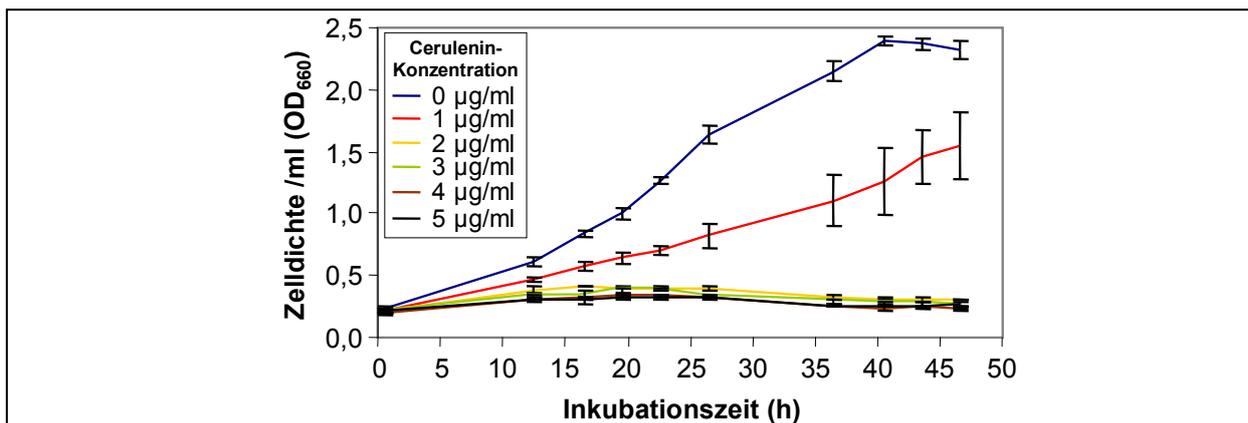
Die Negativkontrolle (blaue Kurve) zeigt das Wachstum von *R. capsulatus* ohne den Einfluss eines Antibiotikums. Während der exponentiellen Wuchsphase erhöhte sich die Zelldichte stetig bis zu einer OD<sub>660</sub> von 2,39 (± 0,038), dann erreichte die Kultur die stationäre Phase. In den Kulturen, in denen das Medium Cerulenin in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben war (rote Kurve), verlief die Wachstumskurve deutlich flacher und erreichte die höchste beobachtete Zelldichte nach 48 Stunden mit einer OD<sub>660</sub> von 1,55 (± 0,268). Diese Konzentration von Cerulenin ist also nicht ausreichend, um das Wachstum der Zellen vollständig zu inhibieren. Ab einer Cerulenin-Konzentration von 2 µg/ml (gelbe Kurve) dagegen war das Wachstum der Zellen vollständig inhibiert.

Nachdem der inhibierende Effekt von Cerulenin auf das Wachstum der Zellen gezeigt werden konnte, sollte als nächstes die Zusammensetzung der Membran Cerulenin-inhibierter Kulturen ermittelt werden. Dazu wurde ebenso vorgegangen wie zur Bestimmung der natürlichen Membranzusammensetzung (Kap. III-2.1.1). In diesem Fall wurden allerdings die Kulturen jeweils in der Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Cerulenin inkubiert. Kulturen ohne Cerulenin dienten als Kontrollen.

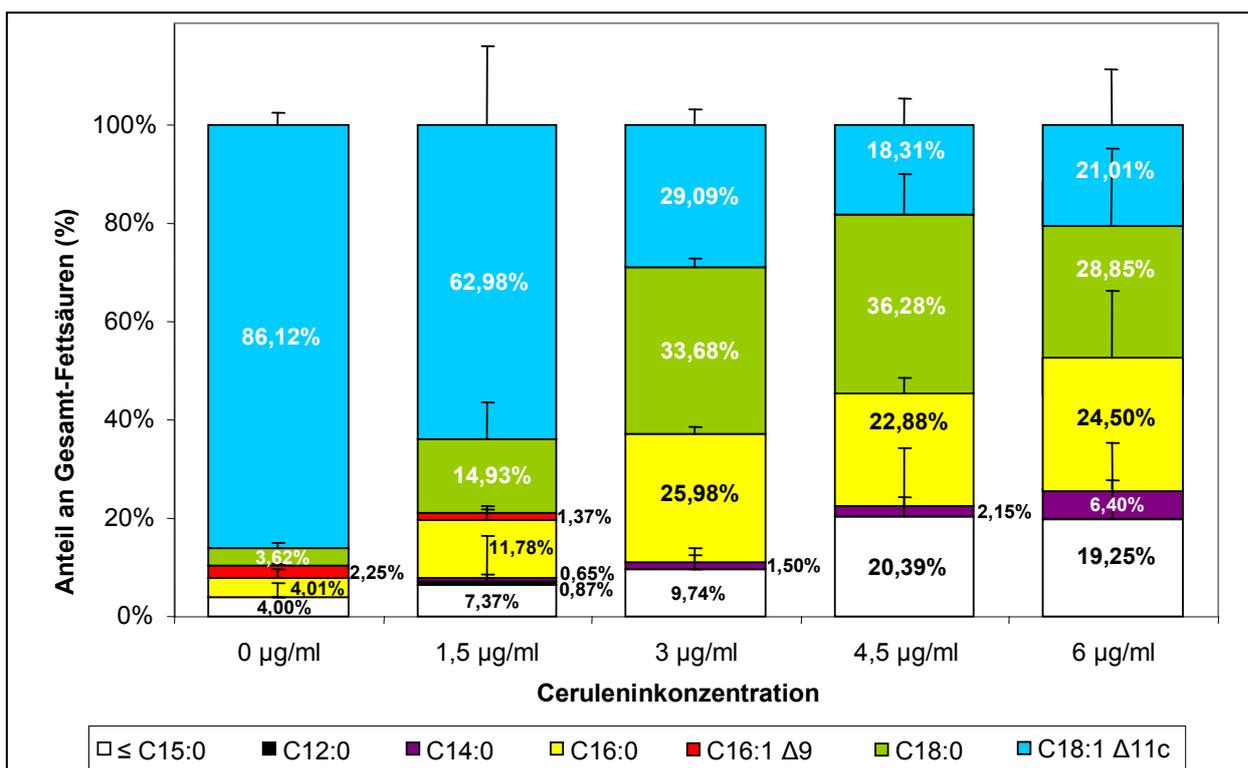
Die Ausbeuten und Anteile der verschiedenen Fettsäuren in den Membranen Cerulenin-freier und Cerulenin-inhibierter Kulturen sind in Tab. VII-3 und Abb. III-12 dargestellt.

Die Kontrollkulturen (0 µg/ml Cerulenin) zeigten die natürliche Fettsäure-Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 (Kap. III-2.1.1). Wurden die Kulturen in der Gegenwart von Cerulenin inkubiert, führte dies zu signifikanten Veränderungen in der Fettsäurenkomposition der Membran (Abb. III-12).

Die Ausbeute der *cis*-Vaccensäure (C18:1 Δ11c, blaue Flächen) war umso geringer, je höher die Cerulenin-Konzentration gewählt war. Durch die Gegenwart von Cerulenin in der höchsten untersuchten Konzentration von 6 µg/ml konnte der Anteil dieser Fettsäure an den Gesamtfettsäuren um den Faktor 4,1 gegenüber der natürlichen Membranzusammensetzung gesenkt werden. Eine starke Reduktion zeigte auch die zweite ungesättigte Fettsäure in der Membran von *R. capsulatus*, Palmitoleinsäure (C16:1 Δ9, rote Flächen). Eine Cerulenin-Konzentration von 1,5 µg/ml verringerte den Anteil dieser Fettsäure auf die Hälfte, während ab einer Cerulenin-Konzentration von 3 µg/ml keine Palmitoleinsäure mehr in den Membranen nachzuweisen war.



**Abb. III-11: Inhibierung des Wachstums von *R. capsulatus* B10S-T7 durch das Antibiotikum Cerulenin**  
*R. capsulatus* B10S-T7 wurde über 48 Stunden phototroph in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Cerulenin angezogen. In regelmäßigen Abständen wurden die Zelldichten der Kulturen bestimmt und aus den Mittelwerten dieser Daten schließlich Wachstumskurven zusammengestellt.



**Abb. III-12: Auswirkungen des Antibiotikums Cerulenin auf die Fettsäure-Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7**

*R. capsulatus* B10S-T7 wurde 48 Stunden unter phototrophen Bedingungen in Gegenwart unterschiedlicher Cerulenin-Konzentrationen inkubiert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden durch Fraktionierung Membranfraktionen präpariert und diese für die gaschromatographische Analyse verwendet. Im Gaschromatogramm wurden die Fettsäure-Bestandteile der Proben identifiziert und ihre Ausbeute bestimmt. Anhand der Ausbeuten wurden die Anteile der einzelnen Fettsäuren in der Membran ermittelt.

Die gesättigten Fettsäuren der *Rhodobacter*-Membran zeigten dagegen eine starke Zunahme. Der Anteil der Stearinsäure (C18:0, grüne Flächen) stieg bei höheren Cerulenin-Konzentrationen immer mehr an, bis schließlich mit 36,82% ( $\pm$  8,15%) Anteil an den Gesamtfettsäuren bei einer Konzentration des Cerulenins von 4,5  $\mu$ g/ml die höchste Ausbeute dieser Fettsäure erzielt wurde. Bei einer höheren Cerulenin-Konzentration zeichnete sich stattdessen allerdings wieder ein Rückgang dieser Fettsäure ab. Auch der Anteil der Palmitinsäure (C16:0, gelbe Flächen) stieg kontinuierlich parallel zur Cerulenin-Konzentration an und erreichte den maximalen Anteil von 25,98% ( $\pm$  1,34%) in der Membran bei einer Cerulenin-Konzentration von 3  $\mu$ g/ml. Auch bei dieser Fettsäure sank der Anteil an den Gesamtfettsäuren bei höheren Cerulenin-Konzentrationen wieder.

Durch den Einsatz von Cerulenin wurden weiterhin zwei Fettsäurespezies angereichert, welche in der natürlichen Zusammensetzung der *R. capsulatus* Membran nicht nachzuweisen waren. Anhand des Vergleichs mit dem externen Standard handelt es sich dabei vermutlich um Laurinsäure und Myristinsäure. Laurinsäure (C12:0, schwarze Fläche) war nur bei einer Cerulenin-Konzentration im Medium von 1,5  $\mu$ g/ml nachzuweisen und machte einen Anteil von 0,87% ( $\pm$  0,76%) aus. Der Anteil der Myristinsäure (C14:0, violette Flächen) an den Gesamtfettsäuren betrug in Gegenwart von 1,5  $\mu$ g Cerulenin 0,88% ( $\pm$  0,61%) an der Gesamtmenge der Fettsäuren. Dieser Anteil stieg mit zunehmender Cerulenin-Konzentration kontinuierlich, bis bei einer Cerulenin-Konzentration von 6  $\mu$ g/ml ein Anteil von 6,40% ( $\pm$  1,75%) dieser Fettsäure in der Membran nachzuweisen war.

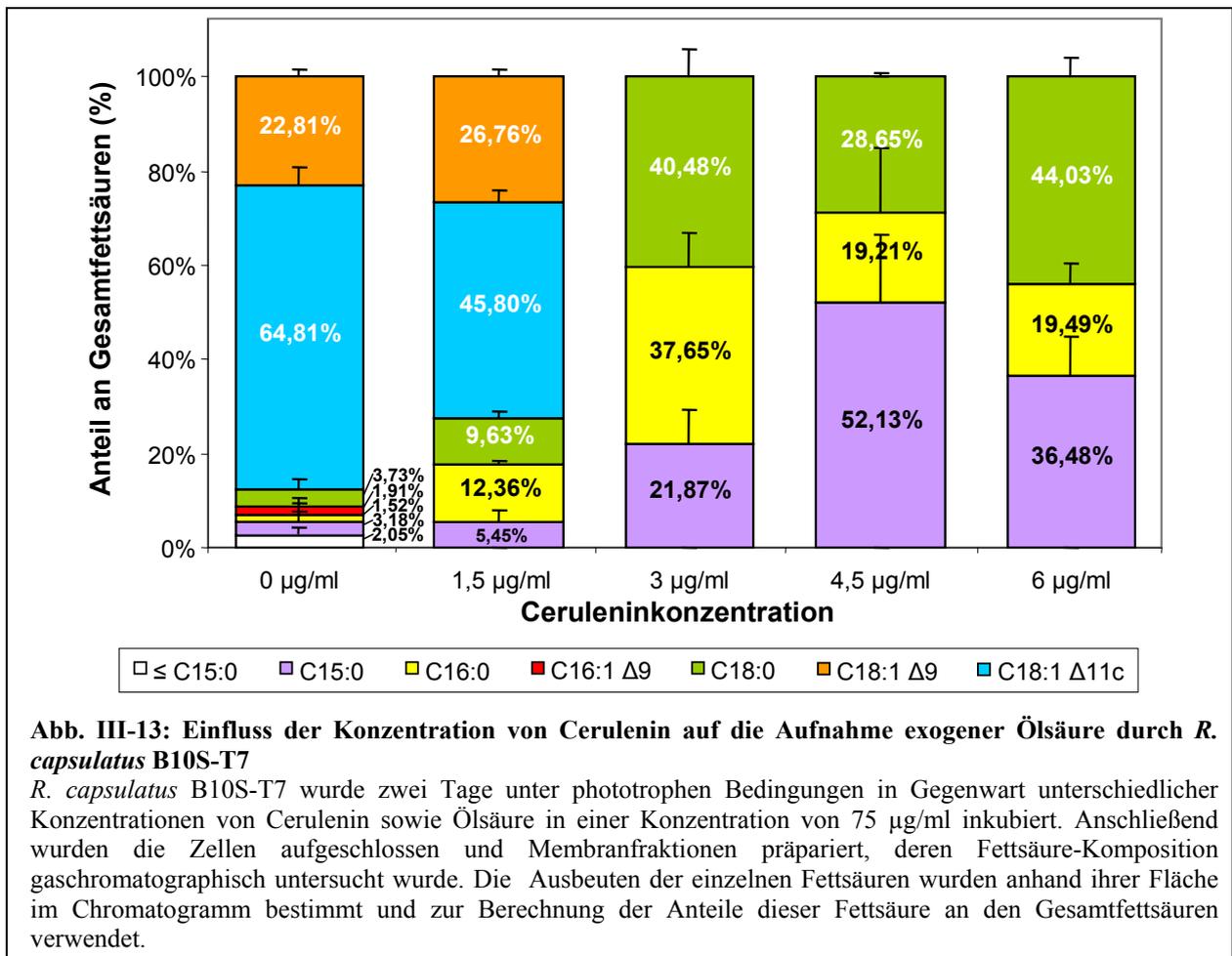
Das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren verlagerte sich mit zunehmender Cerulenin-Konzentration also immer mehr zugunsten der gesättigten Fettsäuren und betrug bei der höchsten Cerulenin-Konzentration 1 : 0,35, das heißt die Membran enthielt bedeutend mehr gesättigte als ungesättigte Fettsäuren.

Schließlich sollte überprüft werden, ob man in Gegenwart von Cerulenin im Kulturmedium die Aufnahmeeffizienz der Zellen für exogene ungesättigte Fettsäuren erhöhen kann. Die experimentelle Vorgehensweise dazu war die gleiche wie zur Analyse des Effekts des Cerulenins selbst (siehe oben). Allerdings wurde dem Medium diesmal zusätzlich Ölsäure als freie Fettsäure in einer Konzentration von 75  $\mu$ g/ml zugesetzt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. VII-4 (Anhang) und Abb. III-13 gezeigt. Ohne den Einfluss von Cerulenin („0  $\mu$ g/ml“) waren die Anteile der natürlichen vorkommenden Fettsäurespezies der Membran (Kap. III-2.1.1) leicht reduziert. Zusätzlich wurde in den Proben noch eine weitere Komponente nachgewiesen, welche anhand eines Standards als Pentadekansäure identifiziert wurde (C15:0, violette Fläche). Auch die exogene

Ölsäure (C18:1 Δ9, orangene Fläche) konnte in der Membran nachgewiesen werden, mit einem Anteil von 22,81% (± 1,48%). Dies zeigt, dass diese exogene Fettsäure von *R. capsulatus* B10S-T7 sehr effektiv aus dem Kulturmedium aufgenommen und in die bakterielle Membran integriert wurde.

Wenn die Zellen in Gegenwart von Cerulenin im Kulturmedium angezogen wurden, wurde Ölsäure mit einem leicht erhöhten Anteil von 26,76% (± 1,55%) in die Membran integriert. Die Inhibition der *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren scheint also in der Tat eine Verbesserung der Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren zu bewirken. Cerulenin-Konzentrationen von 3 µg oder mehr pro Milliliter Kulturmedium führten dagegen dazu, dass keinerlei Ölsäure in den Membranen mehr nachzuweisen war. Das deutet darauf hin, dass diese Cerulenin-Konzentrationen mit der Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium oder deren Einbau in die bakterielle Membran interferieren.



**Abb. III-13: Einfluss der Konzentration von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Ölsäure durch *R. capsulatus* B10S-T7**

*R. capsulatus* B10S-T7 wurde zwei Tage unter phototrophen Bedingungen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Cerulenin sowie Ölsäure in einer Konzentration von 75 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und Membranfraktionen präpariert, deren Fettsäure-Komposition gaschromatographisch untersucht wurde. Die Ausbeuten der einzelnen Fettsäuren wurden anhand ihrer Fläche im Chromatogramm bestimmt und zur Berechnung der Anteile dieser Fettsäure an den Gesamtfettsäuren verwendet.

Zusätzlich konnten ähnliche Effekte beobachtet werden wie bei den vorangegangenen Versuchen zur Wirkung des Cerulenin: Der Anteil der ungesättigten Fettsäuren *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Flächen) und Palmitoleinsäure (C16:1  $\Delta$ 9, rote Flächen) wurde bei einer Cerulenin-Konzentration von 1,5  $\mu$ g/ml deutlich reduziert, und ab einer Cerulenin-Konzentration von 3  $\mu$ g/ml konnten keinerlei ungesättigte Fettsäuren mehr in der Membran nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist überraschend, da bei den Experimenten zu den Auswirkungen von Cerulenin auf die Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* selbst in Gegenwart hoher Dosen Cerulenin noch ein kleiner Anteil *cis*-Vaccensäure in der Membran nachzuweisen war. Gleichzeitig wurden höhere Anteile der gesättigten Fettsäuren (C18:0, grüne Flächen; C16:0, gelbe Flächen) festgestellt als in der natürlichen Membranzusammensetzung: Stearinsäure erreichte bis zu 44,03% ( $\pm$  3,95%), Palmitinsäure bis zu 37,65% ( $\pm$  7,47%). Dagegen konnten in diesen Proben keine kurzkettigen Bestandteile ( $\leq$  C15:0, weiße Flächen) nachgewiesen werden. Der Anteil der in den Ölsäure-supplementierten, nicht Cerulenin-inhibierten Kulturen nachgewiesenen Pentadekansäure dagegen nahm mit der Cerulenin-Konzentration zu und erreichte bei einer Cerulenin-Konzentration von 4,5  $\mu$ g/ml einen Anteil von mehr als der Hälfte der Gesamtfettsäuren.

Das Antibiotikum Cerulenin inhibierte ab einer Cerulenin-Konzentration von 2  $\mu$ g/ml das Wachstum der Zellen vollständig.

Diese Inhibition des Wachstums ging einher mit deutlichen Veränderungen in der Zusammensetzung der *R. capsulatus* Membran. Der Anteil der ungesättigten Fettsäuren an der Membranzusammensetzung sank auf bis zu 21,01% Anteil an der Membran bei einer Cerulenin-Konzentration von 6  $\mu$ g/ml. Zugleich stiegen die Anteile der gesättigten Fettsäuren. Der Rückgang der ungesättigten Fettsäuren und der Anstieg der gesättigten Fettsäuren in der Membranzusammensetzung belegen, dass das Antibiotikum Cerulenin spezifisch die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren hemmt. Zusätzlich wurde eine verstärkte Akkumulation kurzkettigen Membrankomponenten beobachtet. Die durch Cerulenin ausgelösten Veränderungen der Membranzusammensetzung waren umso ausgeprägter, je mehr Cerulenin dem Medium zugefügt wurde.

Wenn dem Medium Ölsäure (C18:1  $\Delta$ 9) hinzugefügt wurde, wurde diese anschließend mit einem Anteil von über 20% in der Membran nachgewiesen. Höhere Cerulenin-Konzentrationen als 1,5  $\mu$ g/ml verhinderten allerdings die Aufnahme von Ölsäure in die bakterielle Membran.

### **2.1.3 Einbau verschiedener exogener Fettsäuren in die Zellmembran von *R. capsulatus***

Anhand der Untersuchungen zur Aufnahme und Integration exogener Fettsäuren in die Zellmembran konnten im vorangehenden Kapitel eine Reihe von Faktoren bestimmt werden, welche die Integration exogener Fettsäuren in die Membran von *R. capsulatus* optimieren. In weiteren Experimenten sollte nun unter Ausnutzung dieser Faktoren untersucht werden, inwieweit *R. capsulatus* B10S-T7 verschiedene exogene Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufnehmen und in seine Membranen einbauen kann.

Die erste untersuchte Fettsäure war *cis*-Vaccensäure, als Beispiel für die Aufnahme einer ungesättigten Fettsäure, welche endogen in *R. capsulatus* vorkommt. In weiteren Experimenten wurden Ölsäure und Linolsäure verwendet. Diese Fettsäuren stellen die Ausgangssubstrate für viele bakterielle und pflanzliche Fettsäure-Desaturasen dar. Zusätzlich wurde auch konjugierte Linolsäure, eine Isoform der Linolsäure mit veränderter Position der Doppelbindungen, sowie die sehr langkettigen und vielfach ungesättigten Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure in Versuchen zur Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium eingesetzt. Bei diesen Fettsäuren sollte untersucht werden, ob sie in die Phospholipide von *R. capsulatus* eingebaut werden, da sie auf diese Weise höhere Stabilität, zum Beispiel zur Verwendung in Ernährungspräparaten, erlangen würden.

Für jede Fettsäure sollte durch gaschromatographische Analyse der Einbau der Fettsäure in die Membran von *R. capsulatus* und die Auswirkungen dieses Vorgangs auf die Zusammensetzung der Membran gezeigt werden. Eine quantitative Bestimmung des Gehalts dieser Fettsäure an den Gesamtfettsäuren sollte Aufschluss über die Effizienz des Einbaus in die Membran.

Zusätzlich wurde für einige der verwendeten Fettsäuren das Wachstum der Zellen mit und ohne Fettsäuren im Medium verglichen. Es wurde bereits festgestellt, dass die Zugabe von Cerulenin zum Kulturmedium das Wachstum der Zellen hemmt, was auf die Verringerung des Gehaltes ungesättigter Fettsäuren in der Membran zurückzuführen ist (Kap. III-2.1.2.3). Die Integration supplementierter Fettsäuren in die Membran sollte es *R. capsulatus* ermöglichen, den Mangel an ungesättigten Fettsäuren auszugleichen und so ein verbessertes Wachstum zu erreichen. Ein solcher Effekt könnte als einfaches Screeningverfahren dienen, um den Einbau organismusfremder Fettsäuren in die Membran oder die Umsetzung membrangebundener gesättigter Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren durch Fettsäure-Desaturasen zu erkennen.

Um den Effekt der Aufnahme exogener Fettsäuren auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurde in der gleichen Weise vorgegangen wie für die Untersuchungen zum

Wachstum der Zellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Cerulenin (Kap. III-2.1.2.3). In diesem Fall wurden die Kulturen immer mit der untersuchten Fettsäure versetzt (75 µg/ml) und sowohl ohne als auch mit Cerulenin (2 µg/ml) im Kulturmedium untersucht. Die Analyse der Fettsäuren-Zusammensetzung der Membran erfolgte gaschromatographisch.

### **2.1.3.1 Assimilation exogener *cis*-Vaccensäure aus dem Kulturmedium**

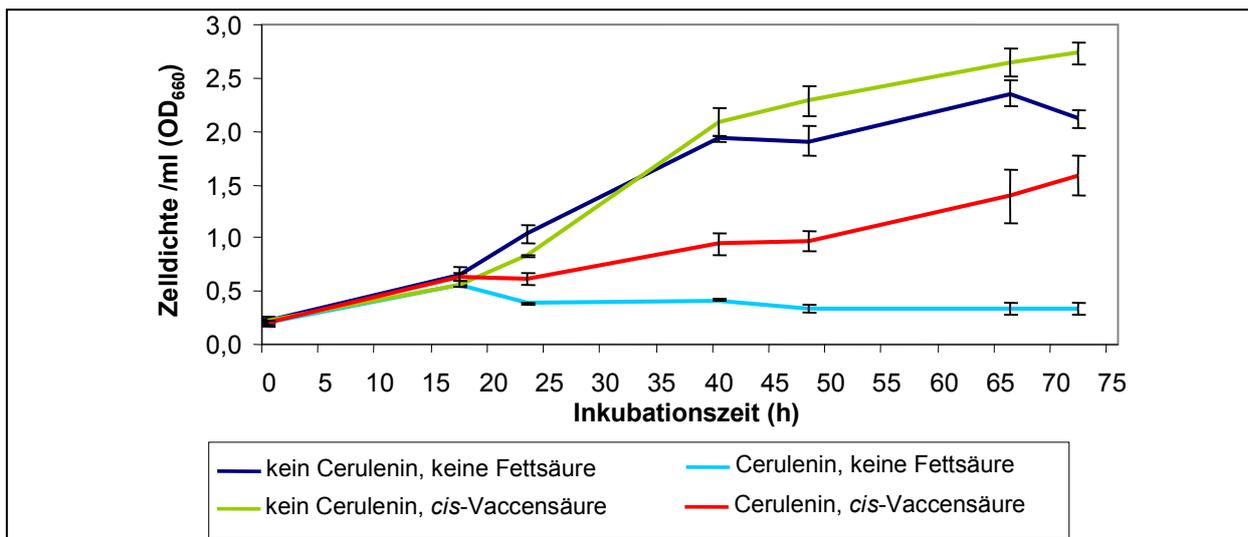
Die erste Fettsäure, deren Aufnahme aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus* B10S-T7 untersucht werden sollte, war *cis*-Vaccensäure. Diese C18:1 Fettsäure trägt in ihrer Kohlenstoffkette eine *cis*-Doppelbindung in der Position  $\Delta 11$ . Sie kommt in Membranen von *R. capsulatus* natürlicherweise mit einem hohen Anteil von über 80% vor (Kap. III-2.1.1). Daher wurde vermutet, dass diese Fettsäure sich leicht aufnehmen und in die Membranen einbauen lässt. Dieses Experiment diente daher als Kontrolle für die weiteren Versuche zur Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium.

Der Effekt der Aufnahme von *cis*-Vaccensäure auf das Wachstum der Zellen ist in Abb. III-14 dargestellt.

Die dunkelblaue Kurve zeigt das Wachstum von *R. capsulatus* B10S-T7, wenn das Medium weder Cerulenin noch eine exogene Fettsäure enthielt. Während der exponentiellen Wuchsphase erreichten die Kulturen eine optische Dichte bei 660 nm von 1,93 ( $\pm 0,03$ ). Danach verringerte sich die Wachstumsrate in der stationären Phase, bis 66 Stunden nach der Inokulation eine OD<sub>660</sub> von 2,35 ( $\pm 0,13$ ) gemessen wurde.

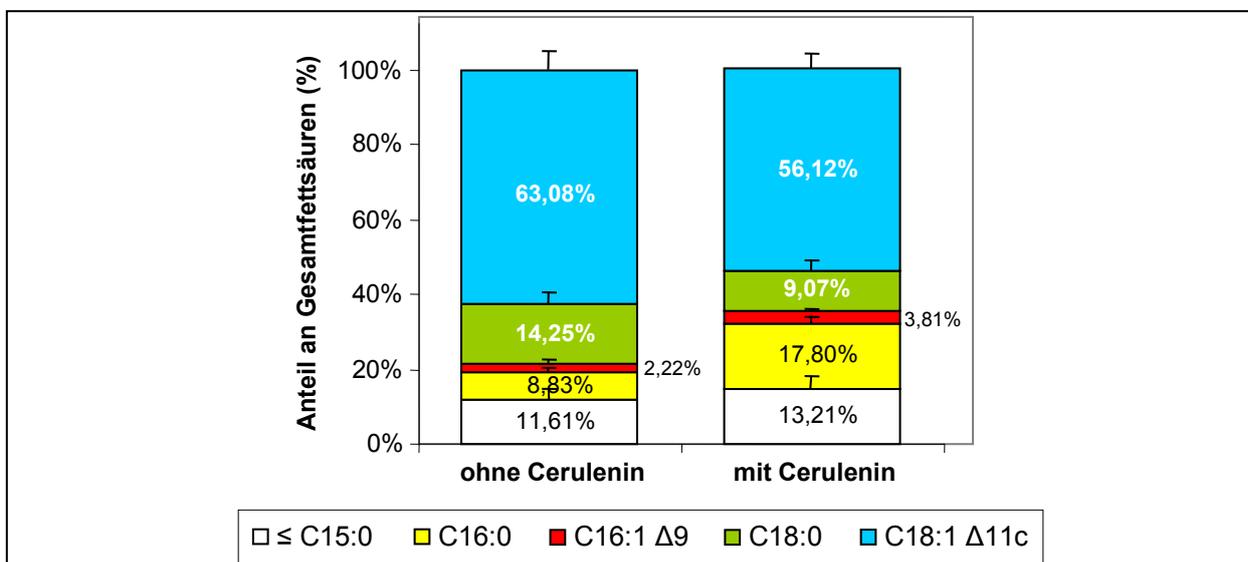
Wenn die Zellen in Gegenwart von *cis*-Vaccensäure inkubiert wurden (grüne Kurve), führte dies gegenüber den Kontrollkulturen (dunkelblaue Kurve) zu einem leicht verbesserten Wachstum: während der exponentiellen Phase stieg die Wachstumskurve steiler an, und in der stationären Phase war die optische Dichte der supplementierten Kulturen höher als die optische Dichte der Kontrollkulturen. Am Ende der Messungen wurde mit 2,73 ( $\pm 0,06$ ) die höchste OD<sub>660</sub> der gesamten Messreihe gemessen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Supplementation mit *cis*-Vaccensäure das Wachstum der Zellen fördert.

Die Gegenwart von Cerulenin im Kulturmedium (hellblaue Kurve) führte wie erwartet zu einem vollständig inhibierten Wachstum von *R. capsulatus* B10S-T7. Am Ende der Messreihe wurde eine OD<sub>660</sub> von 0,34 ( $\pm 0,06$ ) gemessen.



**Abb. III-14: Effekt exogener *cis*-Vaccensäure auf das Wachstum Cerulenin-inhibierter Kulturen von *R. capsulatus***

*R. capsulatus* B10S-T7 wurde entweder mit Cerulenin (2 µg/ml), mit *cis*-Vaccensäure (75 µg/ml) oder mit beiden Komponenten im Medium inkubiert. Als Kontrollen dienten Kulturen mit keinem dieser Zusätze. Die Kulturen wurden zwei Tage unter phototrophen Bedingungen inkubiert und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte der Kulturen bei 660 nm bestimmt. Anhand dieser Daten wurden Wachstumskurven zusammengestellt.



**Abb. III-15: Auswirkungen von Cerulenin auf die Fettsäurenkomposition der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 nach Kultivierung in Gegenwart exogener *cis*-Vaccensäure**

Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 wurden entweder in Gegenwart von *cis*-Vaccensäure (75 µg/ml) oder *cis*-Vaccensäure und Cerulenin (2 µg/ml) für zwei Tage unter phototrophen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen, und durch Fraktionierung Membranfraktionen präpariert. Diese wurden einer gaschromatographischen Analyse unterzogen. Anhand der Daten des Chromatogramms konnten die Fettsäure-Bestandteile der Membranfraktionen identifiziert und ihre Ausbeuten sowie ihre Anteile an den Gesamtfettsäuren der Membran bestimmt werden.

Die Inkubation von Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 in Gegenwart von sowohl Cerulenin (rote Kurve) als auch *cis*-Vaccensäure resultierte in einem gegenüber den Cerulenin-inhibierten Kulturen (hellblaue Kurve) deutlich verbesserten Wachstum. Während der 72stündigen Inkubation nahm die optische Dichte bei diesen Kulturen immer weiter zu, bis am Endpunkt der Messung eine OD<sub>660</sub> von 1,59 ( $\pm$  0,10) gemessen wurde, was für diese Messreihe die maximale Zelldichte war. Obwohl das Wachstum damit immer noch geringer war als in den nicht mit Cerulenin inhibierten Kontrollkulturen (dunkelblaue und grüne Kurven), erreichten die Kulturen am Endpunkt der Messung ca. 75% des normalen Wachstums.

*Cis*-Vaccensäure besitzt zwar auch in Abwesenheit von Cerulenin einen wachstumsfördernden Effekt (grüne Kurve), allerdings resultierte dieser nur in einer Wachstumsförderung von etwa 25% gegenüber den Kontrollkulturen (dunkelblaue Kurve).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *cis*-Vaccensäure in der Lage ist, das Cerulenin-inhibierte Wachstum der Zellen wieder herzustellen. Das bedeutet, dass die Zellen in der Tat in der Lage sind, die exogene Fettsäure aufzunehmen und anstelle der endogenen *cis*-Vaccensäure in die Membran einzubinden.

Die Fettsäuren-Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* sind in Tab. VII-5 (Anhang) und Abb. III-15 dargestellt.

Unabhängig davon, ob dem Kulturmedium Cerulenin zugesetzt wurde oder nicht, stellte *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Flächen) den Hauptanteil der Fettsäuren der Membran dar. Mit einem Anteil an den Gesamtfettsäuren der Membran von 63,08% ( $\pm$  5,53%) ohne Cerulenin und einem Anteil von 56,12% ( $\pm$  3,05%) in Gegenwart von Cerulenin war der Anteil dieser Fettsäure an der Membran fast identisch. Überraschenderweise war der Anteil der *cis*-Vaccensäure damit geringer als in der natürlichen Zusammensetzung der Membran (Abb. III-12, „0  $\mu$ g/ml“). Von den übrigen typischen Bestandteilen der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 blieb nur der Anteil der Palmitoleinsäure (C16:1  $\Delta$ 9, rote Flächen) nahezu unverändert gegenüber dem natürlichen Anteil dieser Fettsäure an der Membran. Bei den gesättigten Fettsäuren Stearinsäure (C18:0, grüne Flächen) und Palmitoleinsäure (C16:0, gelbe Flächen) waren in den Kulturen, die kein Cerulenin enthielten, die prozentualen Anteile an der Membranzusammensetzung dagegen auf den doppelten (Palmitinsäure) bzw. dreifachen Wert (Stearinsäure) erhöht, und auch der Anteil der kurzkettigen Komponenten ( $\leq$  C15:0, weiße Flächen) war höher als bei der natürlichen Membranzusammensetzung. Auch wenn Cerulenin im Medium zugegen war, erzielten die Kulturen höhere Anteile dieser Werte als

von den Versuchen zur Wirkung des Cerulenin her vermutet. Das Verhältnis der gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren betrug 1 : 2,8 ohne Cerulenin im Kulturmedium und 1 : 2,2 wenn die Kulturen mit Cerulenin inhibiert wurden. In beiden Fällen waren also deutlich weniger ungesättigte Fettsäuren in der Membran enthalten als erwartet.

Die Ergebnisse zeigen, dass Cerulenin in der Gegenwart einer exogenen Fettsäure im Kulturmedium keinen Effekt mehr auf die Biosynthese der C18-Fettsäuren besitzt.

### 2.1.3.2 Assimilation exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium

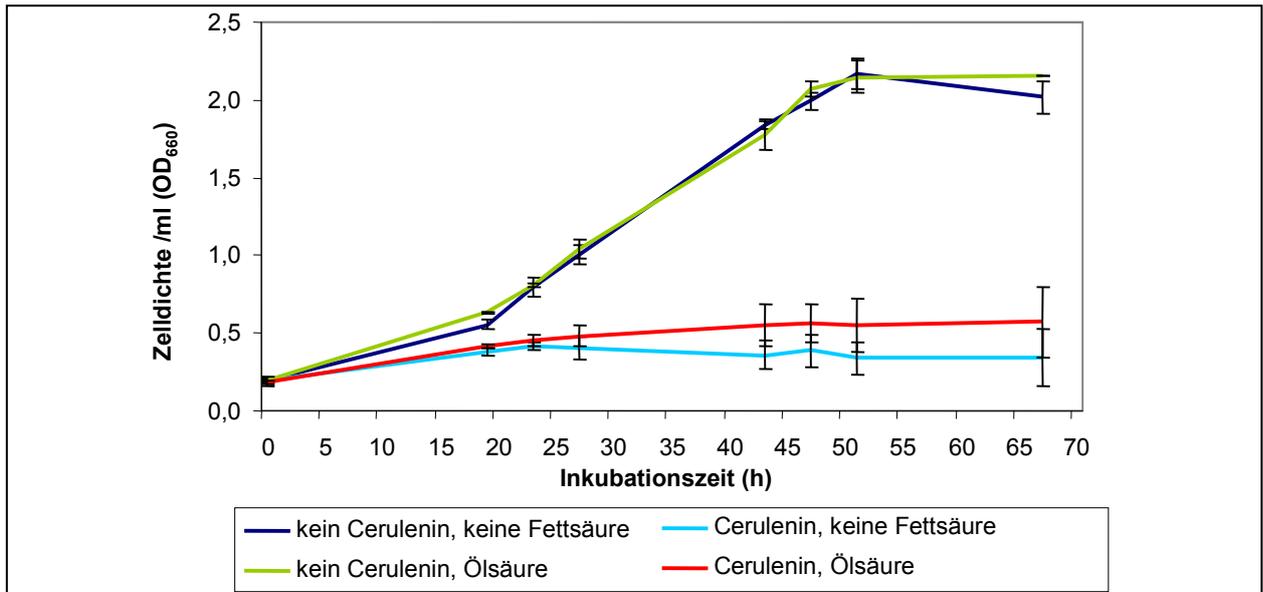
Ölsäure ist eine C18-Fettsäure mit einer einzelnen Doppelbindung in Position  $\Delta 9$ . Sie ist ein häufiges Substrat für bakterielle und pflanzliche Fettsäure-Desaturasen. Die typische Umsetzung ist dabei die Addition einer zweiten Doppelbindung in der Position  $\Delta 12$  und damit die Bildung der Linolsäure. In den Versuchen sollte untersucht werden, ob Ölsäure ebenso wie *cis*-Vaccensäure die Wirkung von Cerulenin komplementieren kann, und ob dies zu einer Erhöhung des Anteils dieser Fettsäure in der Membran gegenüber ohne Cerulenin gewachsenen Kulturen führt.

In Abb. III-16 ist das Wachstum der Bakterien gegen die Zeit aufgetragen.

Die dunkelblaue Kurve zeigt das Wachstum von *R. capsulatus* B10S-T7, wenn das Medium weder Cerulenin noch Ölsäure enthielt. In der exponentiellen Wachstumsphase erhöhte sich die OD<sub>660</sub> auf die maximale optische Dichte von 2,17 ( $\pm 0,10$ ), welche 52 Stunden nach der Inokulation erreicht wurde.

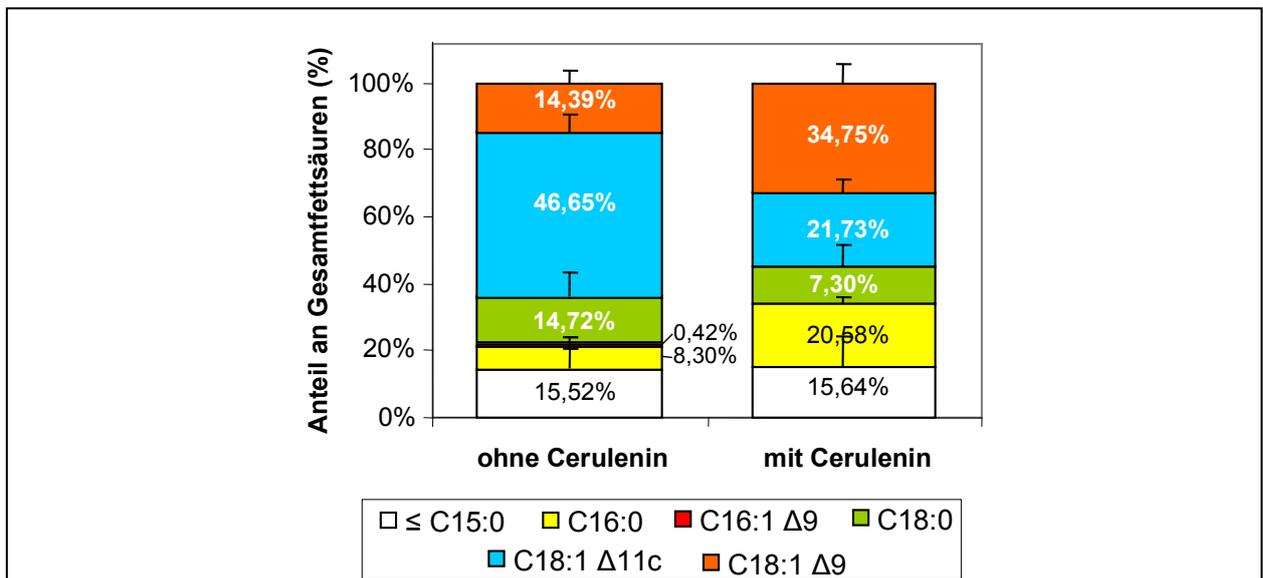
Wurde dem Medium ohne die Gegenwart von Cerulenin Ölsäure zugegeben (grüne Kurve), unterschied sich das Wachstum der Zellen von dem Wachstum nicht supplementierter Kulturen nur unwesentlich. Die gemessenen optischen Dichten waren nahezu identisch zu den Werten der nicht supplementierten Kulturen. Ölsäure behindert *R. capsulatus* B10S-T7 offenbar weder im Wachstum noch gibt sie dem Organismus einem Vorteil, etwa durch Verstoffwechslung der Fettsäure als zusätzliche Energiequelle.

Die Zugabe von Cerulenin zu Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 ohne die Gegenwart von Ölsäure im Kulturmedium führte zu einer vollständigen Wachstumsinhibierung (hellblaue Kurve). Die höchste OD<sub>660</sub> in diesen Kulturen wurde mit 0,41 ( $\pm 0,01$ ) nach 24 Stunden gemessen. Danach sank die optische Dichte bis zum Endpunkt der Messung stetig ab bis zu einem Wert von 0,34 ( $\pm 0,18$ ). Dies entspricht der erwarteten wachstumsinhibierenden Wirkung des Cerulenin (Kap. III-2.1.2.3).



**Abb. III-16: Komplementation der wachstumsinhibierenden Wirkung von Cerulenin durch Aufnahme exogener Ölsäure**

Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 wurden in einem Kulturvolumen von 15 ml entweder ohne Zusätze, mit Cerulenin (2 µg/ml), Ölsäure (75 µg/ml) oder beiden Komponenten inkubiert. Während der zweitägigen Inkubation unter phototrophen Anzuchtbedingungen wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte aller Kulturen bei 660 nm gemessen und diese Werte zur Auftragung von Wachstumskurven verwendet.



**Abb. III-17: Auswirkungen von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus***

*R. capsulatus* B10S-T7 wurde in einem Kulturvolumen von 100 ml in Gegenwart von entweder freier Ölsäure (75 µg/ml) oder freier Ölsäure und Cerulenin (2 µg/ml) für zwei Tage unter phototrophen Bedingungen inkubiert. Nach der Ernte der Zellen wurden diese aufgeschlossen und Membranfraktionen isoliert. Die Fettsäure-Zusammensetzung der Membranfraktionen wurde im Gaschromatographen analysiert. Anhand des Chromatogramms wurden die Fettsäurespezies in den Proben identifiziert und ihre Ausbeuten sowie Anteile an den Gesamtfettsäuren der Membran bestimmt.

Die Gegenwart von Ölsäure in Cerulenin-inhibierten Kulturen (rote Kurve) resultierte in einer leichten Verbesserung des Wachstums gegenüber nicht supplementierten Kulturen, so dass etwa 25% des nicht inhibierten Wachstums wieder hergestellt werden konnten. Damit konnte gezeigt werden, dass Ölsäure das Wachstum Cerulenin-inhibierter Kulturen verbessern kann, allerdings ist das Ausmaß dieser Verbesserung nur gering.

Die Ausbeuten der Fettsäuremethylester bei der Analyse der Membranzusammensetzung der Ölsäure-supplementierten Kulturen sind in Tab. VII-6 (Anhang) angegeben. Die Anteile der Fettsäuren an der Gesamtmenge der Fettsäuren in der Membran sind in Abb. III-17 dargestellt.

Der Anteil des natürlichen Hauptbestandteils der Membran, *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Flächen), wurde stark reduziert auf 46,65% ( $\pm$  5,31%) der Gesamtfettsäuren wenn kein Cerulenin im Medium zugegen war, und 21,73% ( $\pm$  2,45%) in Gegenwart von Cerulenin. Gleichzeitig wurden erhöhte Anteile der gesättigten Fettsäuren sowie der kurzkettigen Komponenten festgestellt. Der verringerte Anteil der *cis*-Vaccensäure auch ohne die Zugabe von Cerulenin zum Medium deutet darauf hin, dass bereits die Gegenwart von Fettsäuren im Medium einen inhibierenden Effekt auf die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren in *R. capsulatus* auslöst.

In Abwesenheit von Cerulenin im Medium konnte in den Membranfraktionen der Kulturen nach der Inkubation in Gegenwart von Ölsäure diese Fettsäure mit einem Anteil von 14,39% ( $\pm$  1,00%) der Gesamtfettsäuren nachgewiesen werden (C18:1  $\Delta$ 9, orangene Fläche). Dies zeigt, dass diese exogene Fettsäure aus dem Kulturmedium aufgenommen und in die bakterielle Membran integriert wurde. Wenn dem Medium Cerulenin dagegen zugegeben wurde, wurde ein prozentualer Anteil dieser Fettsäure von 34,75% ( $\pm$  3,00%) der Gesamtfettsäuren in die Membran von *R. capsulatus* integriert. Cerulenin verstärkt also effizient die Aufnahme dieser exogenen Fettsäure und ihren Einbau in die bakterielle Membran.

### **2.1.3.3 Assimilation exogener Linolsäure aus dem Kulturmedium**

Die nächste Fettsäure, deren Aufnahme aus dem Kulturmedium und Einbau in die Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 untersucht werden sollte, war Linolsäure. Diese Fettsäure verfügt über eine Kohlenstoffkette mit 18 C-Atomen und trägt zwei Doppelbindungen in den Positionen  $\Delta$ 9 und  $\Delta$ 12. Sie ist in der Nahrungsmittelindustrie von Bedeutung und dient

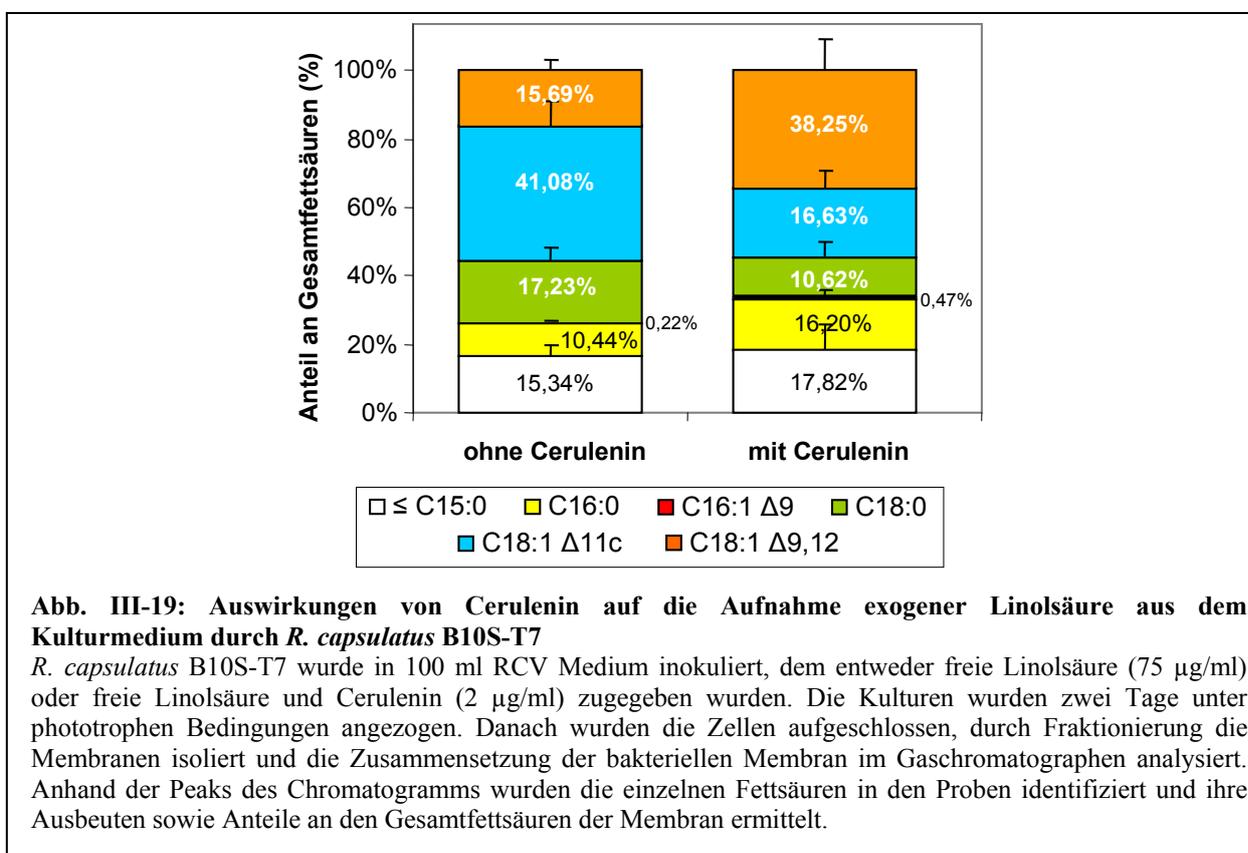
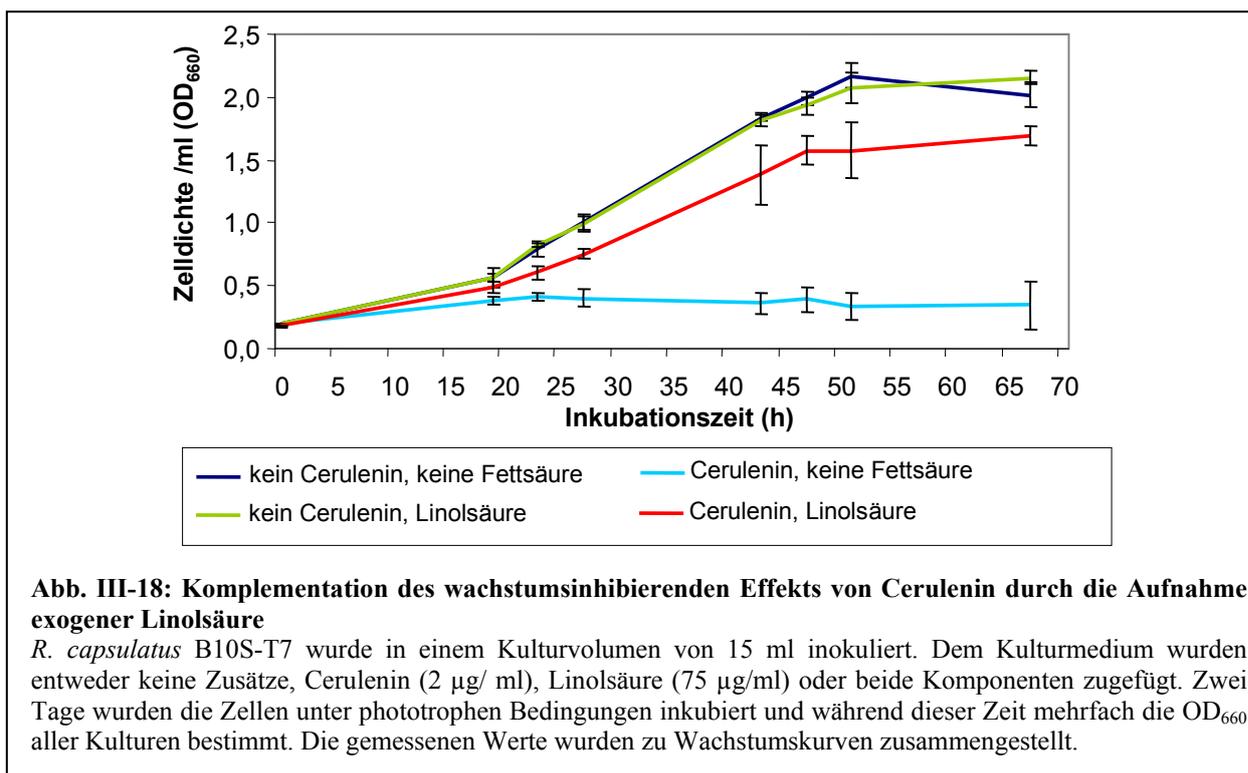
zudem als Vorstufe für die Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Auch für diese Fettsäure wurde bereits gezeigt, dass sie von *R. capsulatus* aus dem Kulturmedium aufgenommen wird. Nun sollte überprüft werden, ob die Zugabe von Cerulenin zum Medium die Effizienz der Assimilation steigern kann.

In Abb. III-18 ist der Effekt der Aufnahme und Integration von Linolsäure auf das Wachstum der Bakterien dargestellt.

Wenn weder Cerulenin noch Linolsäure im Medium zugegen waren (dunkelblaue Kurve) erreichten die Kulturen nach etwa 52 Stunden die höchste beobachtete Zelldichte mit einer  $OD_{660}$  von 2,17 ( $\pm 0,10$ ). Während der darauf folgenden stationären Phase nahm die Zelldichte bis zum Endpunkt der Messung wiederum leicht ab und erreichte schließlich eine  $OD_{660}$  von 2,02 ( $\pm 0,10$ ). Die Zugabe von Linolsäure zu Cerulenin-freien Kulturen führte keine wesentliche Veränderung des Wachstums herbei (grüne Kurve). Während der exponentiellen Wuchsphase zwischen 20 und 52 Stunden erreichte die Zelldichte eine  $OD_{660}$  von 2,07 ( $\pm 0,12$ ).

In der Gegenwart von Cerulenin (hellblaue Kurve) war das Wachstum der Zellen vollständig inhibiert. Die maximale  $OD_{660}$  betrug 0,41 ( $\pm 0,01$ ) nach 24 Stunden. Wurde dagegen Linolsäure in Cerulenin-inhibierten Kulturen eingesetzt, bewirkte dies einen erheblichen Wachstumseffekt. Während der exponentiellen Wuchsphase erreichten die Kulturen eine optische Dichte von 1,57 ( $\pm 0,12$ ) nach 48 Stunden Inkubationszeit. Über diesen Zeitpunkt hinaus war nur noch ein schwaches Wachstum zu beobachten bis zu einer  $OD_{660}$  von 1,69 ( $\pm 0,07$ ) am Endpunkt der Messung. Obwohl diese Werte nicht an das Wachstum im Standardmedium heranreichen, konnte durch die Verwendung von Linolsäure im Medium das natürliche Wachstum der Zellen zu 75% wiederhergestellt werden. Damit wirkte Linolsäure bei der Komplementation des wachstumshemmenden Effekts von Cerulenin stärker als Ölsäure (Kap. III-2.1.3.2). Offensichtlich eignet sich diese Fettsäure sehr gut, den Mangel an ungesättigten Fettsäuren in den Membranen Cerulenin-inhibierten Kulturen auszugleichen.

In Tab. VII-7 (Anhang) und Abb. III-19 ist die Membrananalyse von Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 gezeigt, die in Gegenwart von Linolsäure im Kulturmedium inkubiert wurden.



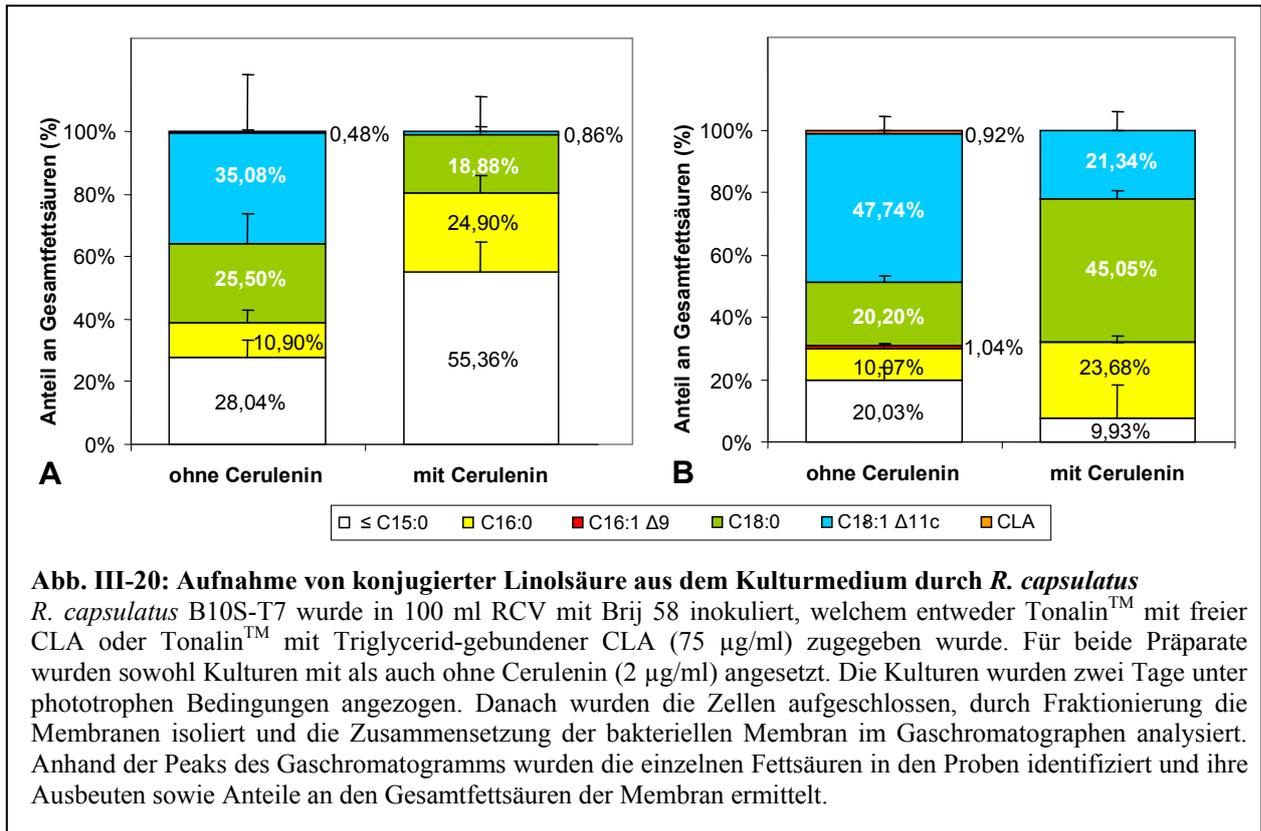
Wie schon bei der Aufnahme exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium (Kap. III-2.1.3.2) wurde auch hier eine starke Reduktion des Anteils der ungesättigten Fettsäuren beobachtet, insbesondere eine Verringerung des Anteils der *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Flächen). Für die gesättigten Fettsäuren Stearinsäure (C18:0, grüne Flächen) und Palmitinsäure (C16:0, gelbe Flächen) dagegen konnte sowohl mit als auch ohne Cerulenin im Medium ein erhöhter Gehalt in der Membran festgestellt werden. Der Anteil der ungesättigten Fettsäuren war somit gegenüber der natürlichen Membranzusammensetzung deutlich erniedrigt, wie es auch bei der Assimilation von Ölsäure gezeigt wurde. Auch Linolsäure scheint demzufolge einen inhibierenden Effekt auf die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren auszuüben. Die Effekte waren allerdings bei der Verwendung exogener Linolsäure ausgeprägter.

In den Kulturen, die nicht durch Cerulenin inhibiert wurden, konnte exogene Linolsäure nach der Inkubation mit einem Anteil von 15,69% ( $\pm$  2,23%) der Gesamtfettsäuren in den Membranen nachgewiesen werden (C18:2  $\Delta$ 9,12, orangene Flächen). Durch die Zugabe von Cerulenin zum Kulturmedium konnte der Anteil dieser exogenen Fettsäure an den Fettsäuren der Membran auf 38,25% ( $\pm$  9,14%) erhöht werden. Auch bei der Aufnahme von Linolsäure wirkt dieses Antibiotikum offenbar positiv auf die Aufnahme wirtsfremder Fettsäuren. Die Verbesserung der Aufnahmeeffizienz war im Fall der Linolsäure allerdings höher als bei der Ölsäure.

#### **2.1.3.4 Assimilation exogener konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium**

Konjugierte Linolsäure ist eine Isoform der Linolsäure, bei der die Positionen der Doppelbindungen so verschoben sind, dass nur eine einzelne Einzelbindung zwischen ihnen liegt (C18:2  $\Delta$ 9,11 oder C18:2  $\Delta$ 10,12). Diese Fettsäure ist ein verbreitetes und wertvolles Ernährungspräparat. Aufgrund der Doppelbindungen ist diese Verbindung allerdings relativ instabil. Daher sollte überprüft werden, ob sich diese Fettsäure in die Phospholipide von *R. capsulatus* integrieren lässt, da die Veresterung einen stabilisierenden Effekt auf ungesättigte Fettsäuren ausübt, und diese Phospholipide damit besser zur Herstellung von Ernährungspräparaten verwendet werden könnten.

Für die Experimente zur Aufnahme konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium wurden Präparate verwendet, die konjugierte Linolsäure (CLA) in einer Konzentration von 80% enthielten (Tonalin<sup>TM</sup>). In einem der verwendeten Präparate war die Fettsäure als freie Fettsäure enthalten, in dem zweiten Präparat in Triglyceriden gebunden.



Die Membranzusammensetzung in Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 nach der Anzucht in Gegenwart konjugierter Linolsäure ist in Tab. VII-7 (Anhang) und Abb. III-20 gezeigt.

Der Zugabe der konjugierten Linolsäure (CLA, orangene Flächen) führte unabhängig davon, in welcher Form CLA in dem zugegebenen Präparat enthalten war, nur zu einem sehr geringen Einbau dieser exogenen Fettsäure in den Membranen von *R. capsulatus* B10S-T7: Der Anteil betrug 0,48% ( $\pm$  0,84%) bei der Verwendung der freien Fettsäuren und 0,92% ( $\pm$  0,19%) bei der Verwendung von Triglyceriden. Wurden die Zellen dagegen in der Gegenwart von Cerulenin angezogen, konnte keine konjugierte Linolsäure in den Membranen nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen der Versuche zur Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium, bei denen durch die Zugabe von Cerulenin eine effizientere Aufnahme der exogenen Fettsäuren in die bakterielle Membran erzielt werden konnte.

Dennoch resultierte die Inkubation der Bakterien in Gegenwart der konjugierten Linolsäure in erheblichen Veränderungen in den Ausbeuten der übrigen Bestandteile der bakteriellen Membran. Der Anteil der *cis*-Vaccensäure (C18:1 Δ11c, blaue Flächen) wurde unabhängig von den Zusätzen des Mediums maximal halb so hoch wie in der natürlichen Zusammensetzung der *Rhodobacter*-Membran. In Kulturen, die sowohl das Tonalin™-Präparat mit freier CLA als auch Cerulenin enthielten, konnte sogar fast keine *cis*-

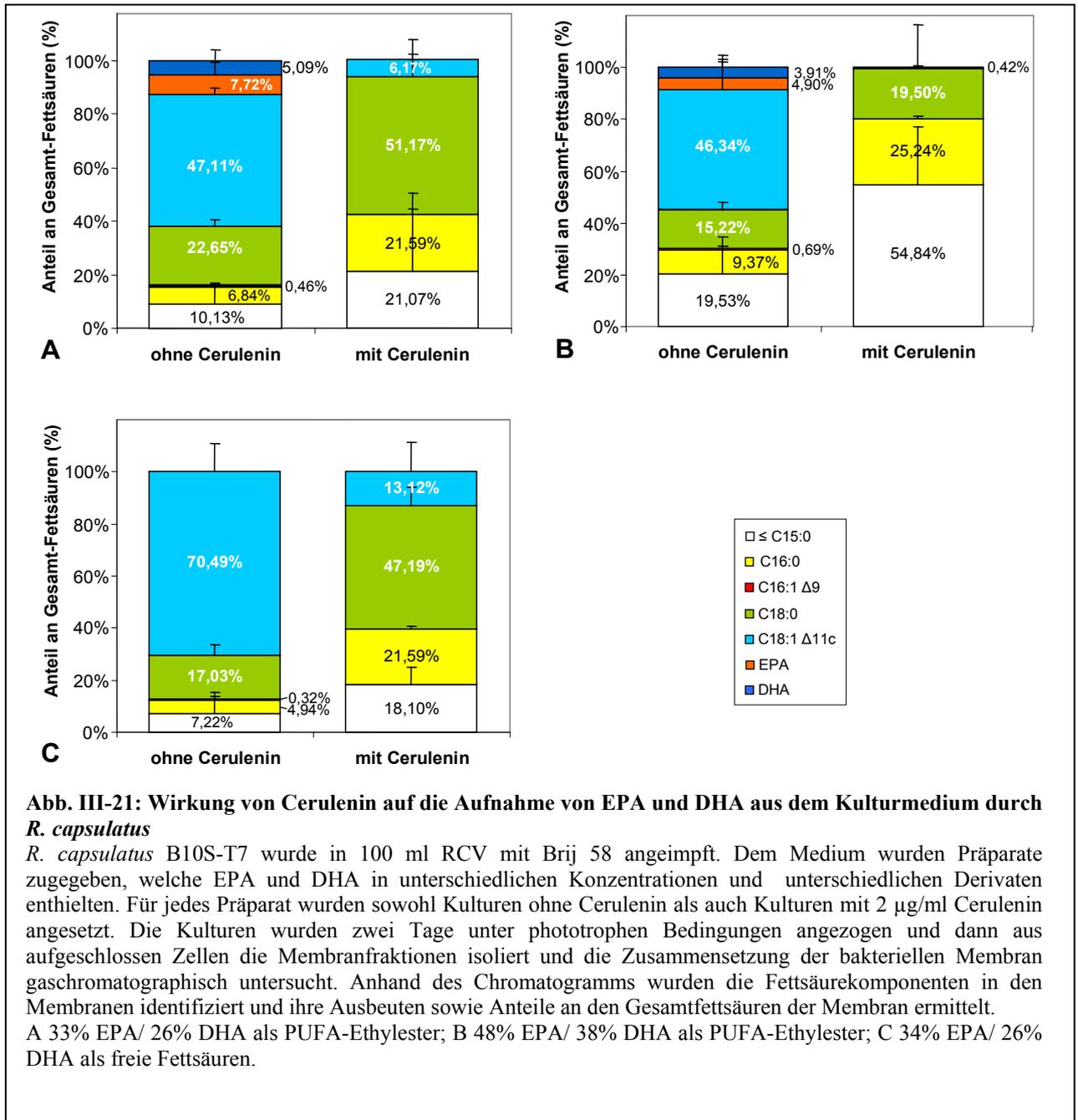
Vaccensäure mehr nachgewiesen werden. Dagegen zeigten sowohl die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0, gelbe Flächen) und Stearinsäure (C18:0, grüne Flächen) als auch die nicht identifizierten kurzkettigen Bestandteile ( $\leq$  C15:0, weiße Flächen) eine starke Erhöhung ihres Gehaltes. Bei dem Tonalin<sup>TM</sup>-Präparat mit freier CLA machten diese Bestandteile in Gegenwart von Cerulenin mehr als die Hälfte der Membranzusammensetzung aus. Gegenüber dem Anteil der jeweiligen Komponente an der natürlichen Membranzusammensetzung von *R. capsulatus* waren die Werte der übrigen Bestandteile mehr als verdoppelt. Diese Effekte zeigen, dass die Gegenwart von konjugierter Linolsäure einen starken inhibierenden Effekt auf die *de novo* Biosynthese der ungesättigten Zellen ausübt. Das deutet darauf hin, dass die Fettsäure durchaus aus dem Medium aufgenommen wurde, und ihr Fehlen in der Membran darauf beruht dass sie danach nicht in diese eingebaut wurde.

### **2.1.3.5 Assimilation exogener Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure aus dem Kulturmedium**

Für bioindustrielle Anwendungen sind besonders lange, mehrfach ungesättigte Fettsäuren („poly-unsaturated fatty acids“, PUFAs) interessant. Zwei Beispiele für diese Gruppe ungesättigter Fettsäuren sind die Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) und die Docosahexaensäure (DHA, C22:6). Von diesen beiden Fettsäuren wurden Kombinationspräparate verwendet, die jeweils beide Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen und Derivaten enthielten.

Wie auch bei den Experimenten zur Aufnahme von konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium bestand das Ziel der Versuche zur Assimilation von EPA und DHA darin, zu untersuchen ob sich diese Fettsäuren effizient in die Phospholipide der Membran integrieren lassen. Die damit einhergehende Stabilisierung wäre von Vorteil für die Verwendung der Fettsäuren in Ernährungspräparaten.

Die Ausbeuten der einzelnen Fettsäurespezies aus den Membranen von *R. capsulatus* B10S-T7 mit exogener EPA und DHA im Medium sind in Tab. VII-9 und Tab. VII-10 (Anhang) angegeben. Die Anteile der Fettsäuren an der Membranzusammensetzung zeigt Abb. III-21.



Wie der Abbildung zu entnehmen ist, konnten EPA und DHA in zwei Fällen erfolgreich in die bakterielle Membran integriert werden: als Präparat mit 33% EPA und 26% DHA als Ethylester (Abb. III-21A) und als Präparat mit 48% EPA und 38% DHA als Ethylester (Abb. III-21B), jeweils ohne Zugabe von Cerulenin (dunkelblaue/ rote Flächen). Im Fall des ersten Präparates war im Durchschnitt der prozentuale Anteil der beiden Fettsäuren mit jeweils 5,09% für DHA bzw. 7,72% für EPA höher als bei dem zweiten Präparat mit 3,91% DHA und 4,90% EPA.

Die Effizienz des Einbaus wirtsfremder Fettsäuren in die bakterielle Membran erreichte zwar für beide Präparate nicht die Effizienz der Aufnahme anderer Fettsäuren aus dem

Kulturmedium, doch bei der Betrachtung beider Komponenten zusammen handelte es sich mit 13,81% für das erste und 8,81% für das zweite Präparat dennoch um einen relativ hohen Anteil der fremden Fettsäure an der Membran. Dies ist ein bemerkenswerter Effekt, da es sich bei den beiden langkettigen, mehrfach ungesättigte Fettsäuren um große Moleküle mit sperriger Struktur handelt. Überraschend ist, dass das höher konzentrierte Präparat zu einem geringeren Einbau der fremden Fettsäuren in die Membran führten. Das deutet darauf hin, dass die Konzentration der exogenen Fettsäuren für die Aufnahme aus dem Kulturmedium nicht relevant ist. Das Verhältnis der Ausbeuten der beiden Fettsäuren ähnelte dabei dem Verhältnis dieser Komponenten in den Präparaten mit etwas mehr EPA als DHA. Das deutet darauf hin, dass keine der beiden Fettsäuren bevorzugt aufgenommen wird.

Bei der Verwendung des Präparates mit 34% EPA und 26% DHA als freie Fettsäuren konnten diese Fettsäuren nach der Inkubation nicht in der Membran nachgewiesen werden (Abb. III-21C). Dies ist überraschend, da in allen bisherigen Experimenten zur Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium die Fettsäuren als freie Fettsäuren eingesetzt wurden und sie dann sehr effizient in die bakterielle Membran integriert wurden. Wenn die Zellen in Gegenwart von Cerulenin inkubiert wurden, konnten bei der Verwendung keines der untersuchten Präparate die beiden fremden Fettsäuren in der Membran nachgewiesen werden (Abb. III-21).

In den Membranfraktionen der untersuchten Kulturen, in denen EPA und DHA in die Membranen integriert wurden (Abb. III-21A/B), war der Anteil der *cis*-Vaccensäure an der Membran bedeutend erniedrigt. Dieser Effekt war verstärkt zu beobachten, wenn neben den Fettsäure-Präparaten auch Cerulenin in den Kulturen enthalten war, obwohl in diesem Fall EPA und DHA nicht in die Membranen integriert wurden. Die Anteile der gesättigten Fettsäuren und der kurzkettigen Komponenten waren wiederum erhöht. Diese Effekte waren auch in den vorangegangenen Experimenten bei der Assimilation von Ölsäure und Linolsäure beobachtet worden. In den Kulturen dagegen, die zwar kein Cerulenin enthielten, aber trotzdem die exogenen Fettsäuren EPA und DHA nicht aus dem Kulturmedium aufgenommen hatten (Abb. III-21C) besaß die Membran nahezu die Zusammensetzung, welche auch die natürliche Membran von *R. capsulatus* aufwies (Kap. III-2.1.1).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EPA und DHA nur in der Form von Ethylestern in die Zellen aufgenommen werden konnten, nicht als freie Fettsäuren. Die Beobachtung, dass diese Fettsäuren in Gegenwart von Cerulenin nicht in die Membranen eingebaut werden konnten, deutet auf einen negativen Effekt des Cerulenins auf den Einbau dieser Fettsäuren hin. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den zuvor ermittelten Ergebnissen für *cis*-

Vaccensäure, Ölsäure und Linolsäure, die zum einen als freie Fettsäuren sehr effizient in die Zellen aufgenommen und zum anderen in der Gegenwart von Cerulenin effizienter in die Membranen eingebaut wurden.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass exogene *cis*-Vaccensäure, Ölsäure, Linolsäure, EPA und DHA von *R. capsulatus* aus dem Kulturmedium aufgenommen und in die bakterielle Membran integriert werden. Die Fettsäuren erreichten dabei Anteile an den Gesamtfettsäuren der Membran von 4 bis 15%. Bei EPA und DHA galt dies allerdings nur bei der Verwendung von Ethylester-Derivaten dieser Verbindungen, nicht für die freien Fettsäuren. Nur eine der untersuchten Fettsäuren, konjugierte Linolsäure, konnte in keinem Versuch in der bakteriellen Membran nachgewiesen werden.

Die Zugabe von 2 µg Cerulenin pro Milliliter Kulturmedium erhöhte im Fall von Ölsäure und Linolsäure die Effizienz der Assimilation der exogenen Fettsäuren und führte zu Anteilen dieser Fettsäuren in der Membran von 35 bzw. 38% der Gesamtfettsäuren. Bei EPA und DHA erfolgte dagegen in Gegenwart von Cerulenin im Medium kein Einbau in die Membran.

Die Aufnahme von *cis*-Vaccensäure, Ölsäure oder Linolsäure aus dem Medium konnte den wachstumshemmenden Effekt des Antibiotikums Cerulenin mit unterschiedlicher Effizienz aufheben.

Die Gegenwart exogener Fettsäuren im Kulturmedium führte zu einer starken Reduktion der *cis*-Vaccensäure in der Membran sowie zu einem höheren Gehalt gesättigter Fettsäuren und kurzkettiger Membranbestandteile. Cerulenin verstärkte diese Wirkung.

#### **2.1.4 Inhibition der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren durch die Deletion von *fabB***

In den vorangegangenen Versuchen zur Aufnahme von Fettsäuren aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass *R. capsulatus* grundsätzlich in der Lage ist, ungesättigte Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufzunehmen und in seine Membran zu integrieren. Dabei konnte in mehreren Fällen die Assimilation wirtsfremder Fettsäuren verbessert werden, indem den Kulturen das Antibiotikum Cerulenin beigelegt wurde. Als Inhibitor der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren reduziert Cerulenin den Anteil endogener ungesättigter Fettsäuren in der Membran und schafft so mehr Raum für den Einbau exogener

Fettsäuren. Zudem verursacht der Mangel an endogenen ungesättigten Fettsäuren einen Selektionsdruck, da die Zellen nur durch die Aufnahme exogener Fettsäuren und deren Einbau in die Zellmembran überleben können.

Die Verwendung von Cerulenin in den Kulturen ist allerdings nicht immer wünschenswert. Zum einen ist dieses Antibiotikum teuer und würde daher die Wirtschaftlichkeit aller bioindustrieller Prozesse, die den Einbau wirtsfremder Fettsäuren in die Zellmembran erfordern, enorm beeinträchtigen. Zum anderen müsste man vor der Nutzung der Produkte dieses Verfahrens, etwa für Nahrungsmittelzusätze, das Antibiotikum aus der Biomasse entfernen, wofür aufwändige Reinigungsverfahren notwendig wären.

Daher wurde in einer Diplomarbeit im Rahmen dieser Doktorarbeit (Gawarzewski, 2009) durch Mutageneseexperimente versucht, Stämme von *R. capsulatus* zu generieren, die keine ungesättigten Fettsäuren synthetisieren können. Es konnte eine Mutante erzeugt werden, in welcher das Gen *fabB* ausgeschaltet wurde. Dieses Gen ist in *E. coli* für die *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren essentiell, während die Synthese gesättigter Fettsäuren nicht beeinträchtigt sein sollte. Die Mutation hat damit den gleichen Effekt wie Cerulenin.

Der Stamm *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* sollte im Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf seine Membranzusammensetzung analysiert werden, um zu ermitteln ob auch in *R. capsulatus* die *de novo* Synthese ungesättigter Fettsäuren verhindert ist. Anschließend sollte die Mutante in Gegenwart verschiedener ungesättigter Fettsäuren angezogen werden, um zu ermitteln ob die Mutation einen Einfluss auf die Aufnahme exogener Fettsäuren und ihren Einbau in die bakterielle Membran hat.

#### **2.1.4.1 Effekt der Mutation auf die Membranzusammensetzung des Stammes *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB***

Das Enzym FabB ist in *E. coli* in den Elongationszyklus der Fettsäure-Biosynthese involviert (Kap. I-1.2). Insbesondere spielt es eine Rolle bei der *de novo* Synthese ungesättigter Fettsäuren. In *E. coli* ist bekannt, dass die Deletion des Gens *fabB* zu Stämmen führt, in denen keine ungesättigten Fettsäuren mehr produziert werden können, während die Synthese der gesättigten Fettsäuren unangetastet bleibt (Wang & Cronan, 2004).

Für *R. capsulatus* wurde die Fettsäure-Biosynthese bislang noch nicht eingehend untersucht, es wurden allerdings durch Sequenzvergleiche Homologien zu einigen Genen der *E. coli* Fettsäure-Biosynthese entdeckt. Daher ist nicht bekannt, inwieweit eine Mutation im Gen

*fabB* sich auf diese Abläufe auswirkt. Um die Auswirkungen dieser Mutation auf die *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren zu ermitteln, sollte die Membranzusammensetzung von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* analysiert werden.

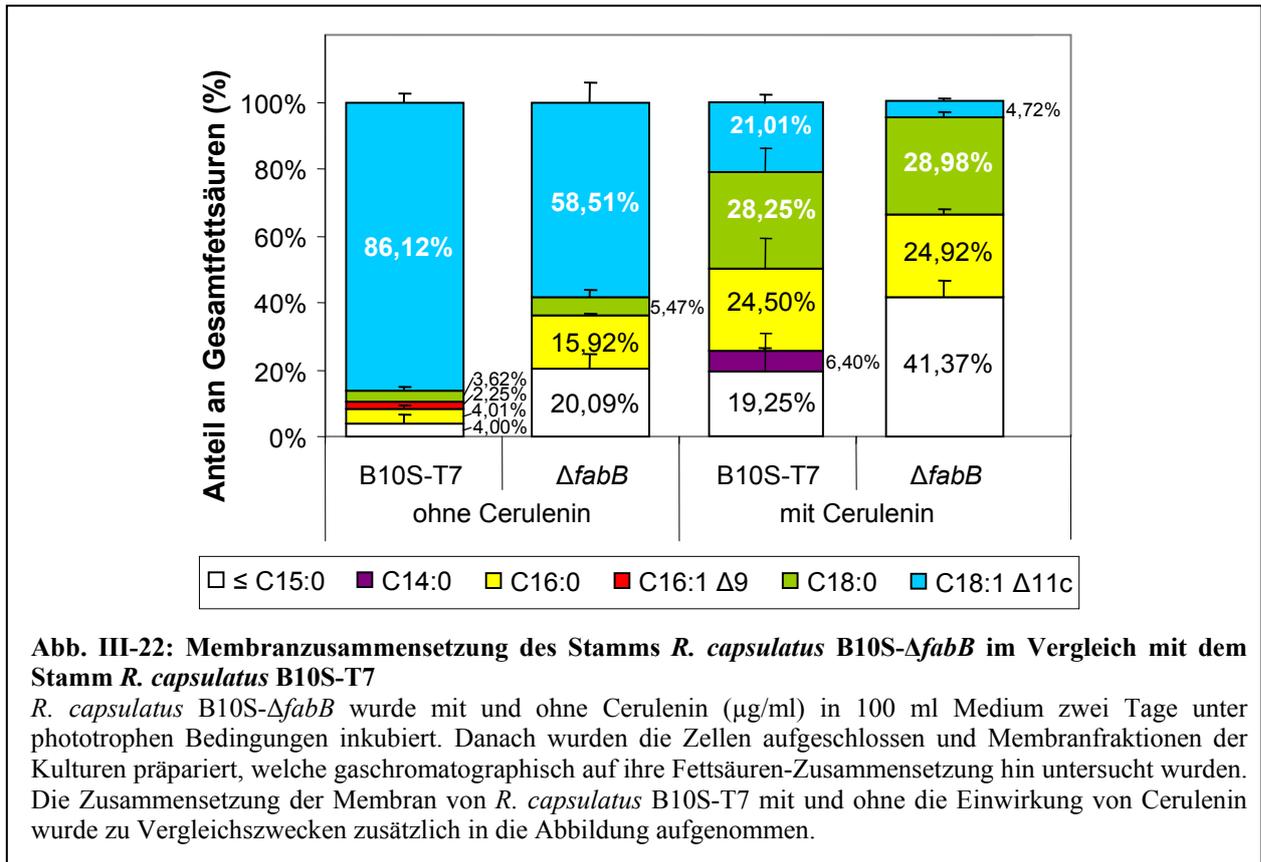
Dazu wurde ebenso vorgegangen wie zur Analyse der natürlichen Membranzusammensetzung von *R. capsulatus* B10S-T7 beschrieben (Kap. III-2.1.1). Zusätzlich zur normalen Membranzusammensetzung wurde bei *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* auch untersucht, wie sich die Gegenwart von Cerulenin (6  $\mu$ g/ml) im Kulturmedium auswirken. Da die Mutation das Enzym ausschaltet, welches das bevorzugte Ziel der Inhibition durch Cerulenin darstellt, sollte auf diese Weise untersucht werden ob die Wirkung von Cerulenin nur dieses Enzym betrifft oder darüber hinaus an weiteren Punkten in die Fettsäure-Biosynthese eingreift.

Die Ausbeuten der verschiedenen Fettsäuren sind in Tab. VII-11 (Anhang) aufgeführt. Das Ergebnis der Analyse der Membranzusammensetzung ist in Abb. III-22 dargestellt.

Anders als *fabB*-defiziente *E. coli*-Stämme, die nur in der Gegenwart von exogenen Fettsäuren wachsen können (Wang & Cronan, 2004), war bei *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* keine Beeinträchtigung des Wachstums zu beobachten.

In den Membranen des Stammes konnten hauptsächlich dieselben Fettsäuren nachgewiesen werden wie in *R. capsulatus* B10S-T7 (Kap. III-2.1.1). Die Anteile der einzelnen Verbindungen an der Gesamtmenge der Fettsäuren in der Membran waren allerdings in den Stämmen *R. capsulatus* B10S-T7 und B10S- $\Delta$ *fabB* unterschiedlich. Der Gehalt der *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Flächen) sank von 86,12% im Wildtyp auf 58,51% ( $\pm$  5,81%) in *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB*. Die Deletion des Gens *fabB* verursachte also eine Reduktion des Gehalts der *cis*-Vaccensäure um etwa ein Drittel. Die zweite ungesättigte Fettsäure in den Membranen von *R. capsulatus*, Palmitoleinsäure, war in dem Stamm B10S- $\Delta$ *fabB* nicht mehr nachzuweisen. Der Membrananteil der Stearinsäure (C18:0, grüne Fläche) verdoppelte sich durch die Mutation, der Anteil der Palmitinsäure (C16:0, gelbe Fläche) war mit 15,92% ( $\pm$  0,49%) fast viermal so hoch wie im Wildtypstamm. Die stärkste Veränderung zeigte sich bei den kurzkettigen Bestandteilen ( $\leq$  C15:0, weiße Fläche), deren Gehalt in den Proben verfünffacht war.

Diese Ergebnisse entsprachen nicht der Erwartung, dass die Deletion von *fabB* die Synthese ungesättigter Fettsäuren völlig inhibiert. Daher wurde der Stamm auch in der Gegenwart von Cerulenin inkubiert, um zu untersuchen ob dieser Inhibitor des Enzyms FabB die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren auch im Stamm B10S- $\Delta$ *fabB* inhibieren kann.



Die Anzucht von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* in der Gegenwart von Cerulenin führte zu einer starken Reduktion des Membrananteils der *cis*-Vaccensäure auf 4,72% und einer verstärkten Akkumulation gesättigter Fettsäuren und kurzkettiger Verbindungen gegenüber den nicht inhibierten Kulturen. Insbesondere der Anteil der Stearinsäure erhöhte sich auf das Fünffache. Die kurzkettigen Komponenten nahmen in diesen Proben fast die Hälfte der Membran ein. Diese Veränderungen entsprach den Veränderungen, die das Antibiotikum Cerulenin in *R. capsulatus* B10S-T7 bewirkte. Der Effekt war in *R. capsulatus*  $\Delta$ *fabB* allerdings zusätzlich verstärkt.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Deletion des Gens *fabB* deutliche Veränderungen in der Membran von *R. capsulatus* auslöst. Es kam zwar nicht wie erwartet zur völligen Inhibition der Biosynthese endogener ungesättigter Fettsäuren, wie sie mit hohen Dosen Cerulenin ausgelöst werden konnte. Allerdings ähnelte das Fettsäuremuster in den Membranfraktionen von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* dem Muster, das in Kulturen beobachtet wurde, welche mit 1,5 $\mu$ g Cerulenin pro ml Kulturmedium versetzt wurde (Kap. III-2.1.2.3).

#### 2.1.4.2 Aufnahme exogener Fettsäuren durch den Stamm *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB*

Die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus*  $\Delta$ *fabB* haben gezeigt, dass die Mutation nur einen schwachen Effekt auf die in den Zellen dieses Stamms enthaltene Menge ungesättigter Fettsäuren ausübt. Nichtsdestotrotz war das Fettsäuremuster dieses Organismus ähnlich einer Inhibition mit geringen Konzentrationen von Cerulenin, wie sie auch bei den bisher durchgeführten Experimenten zur Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium verwendet wurden. Daher sollte nun untersucht werden, ob die Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren durch die Mutation beeinflusst wird.

Dazu wurde ebenso vorgegangen wie zur Analyse der natürlichen Zusammensetzung der *Rhodobacter*-Membran (Kap. III-2.1.1). Der Stamm *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* wurde allerdings in diesem Fall in der Gegenwart exogener Ölsäure oder Linolsäure mit einer Konzentration von 75  $\mu$ g pro Milliliter Kulturmedium inkubiert. Da die Gegenwart von Cerulenin im Kulturmedium bei den Experimenten mit *R. capsulatus* B10S-T7 die Aufnahme dieser Fettsäuren verbessern konnte, wurde auch der Stamm *R. capsulatus* sowohl ohne das Antibiotikum Cerulenin im Medium als auch in Gegenwart von Cerulenin in einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml untersucht.

Die Membranzusammensetzung in Kulturen von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB*, die in Gegenwart von Ölsäure und Linolsäure als exogenen Fettsäuren inkubiert wurden, zeigen Tab. VII-12 (Anhang) und Abb. III-23.

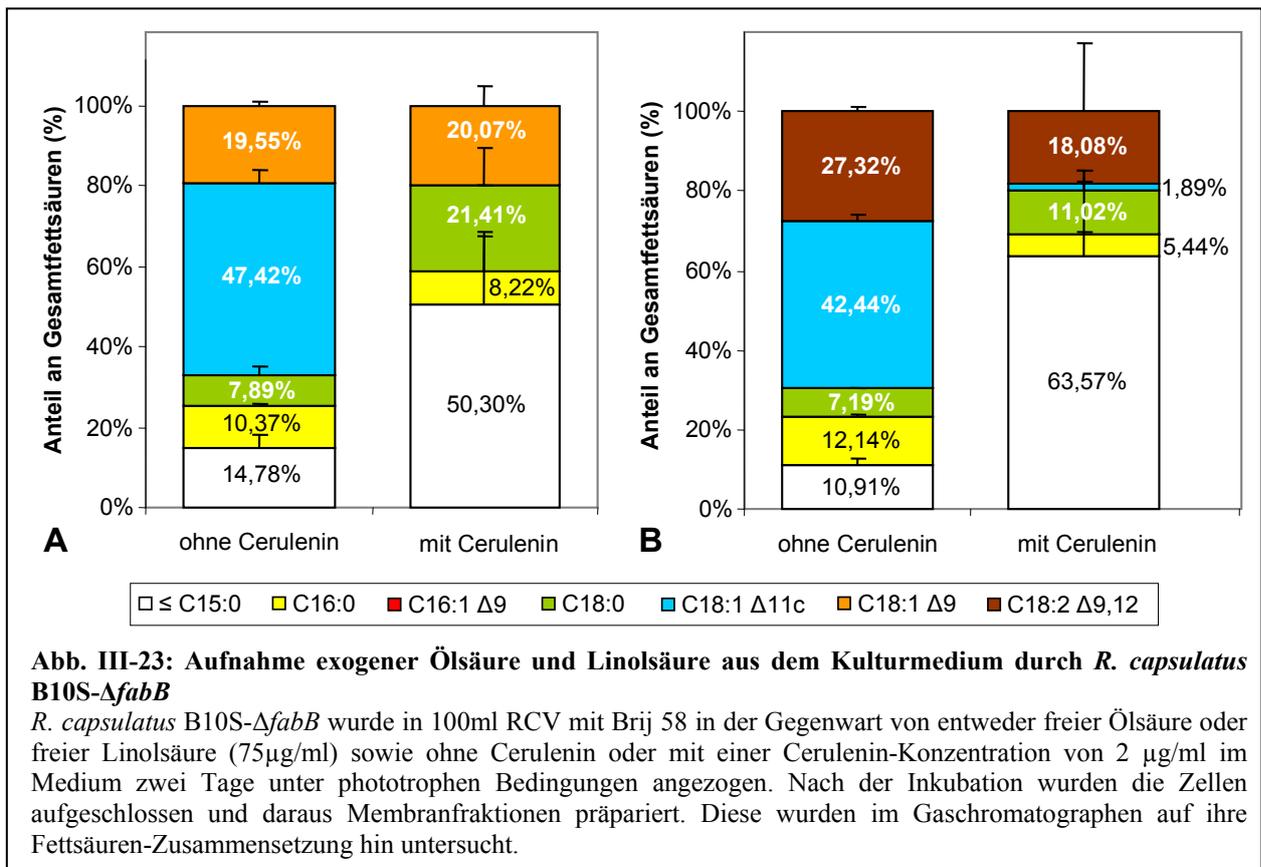
Die Membranen der Zellen zeigten nach der Anzucht in der Gegenwart beider Fettsäuren erhebliche Veränderungen ihrer Zusammensetzung: Der Anteil der *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ 11c, blaue Flächen) war erniedrigt, während die gesättigten Fettsäuren jeweils erhöhte Anteile aufwiesen. Diese Effekte wurden sowohl in der Membranzusammensetzung des Stamms *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* als auch bei anderen Versuchen in der Gegenwart von Fettsäuren im Medium beobachtet worden. Sie traten hier aber deutlicher auf, was vermutlich auf der Kombination der Wirkungen beruht. Die Gegenwart von Cerulenin im Medium verstärkte die Effekte zusätzlich; insbesondere konnte fast keine *cis*-Vaccensäure (blaue Flächen) mehr in den Kulturen nachgewiesen werden und die Anteile der kurzkettigen Membranbestandteile (weiße Flächen) stiegen auf mehr als die Hälfte der Gesamtfettsäuren.

Die exogene Ölsäure konnte in den Membranen von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* mit einem Anteil von 19,55% ( $\pm$  0,77%) in den Proben nachgewiesen werden (Abb. III-23A, orangene Flächen). Im Vergleich dazu war in *R. capsulatus* B10S-T7 bei der Aufnahme exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium unter den gleichen Anzuchtbedingungen ein Anteil der wirtsfremden Fettsäure von 14,39% (Abb. III-17) erzielt worden. Die Aufnahmeeffizienz für

exogene Ölsäure war in *R. capsulatus* B10S- $\Delta fabB$  also leicht erhöht. Die sehr hohe Aufnahmeeffizienz für Ölsäure, die durch die Zugabe von Cerulenin zum Kulturmedium erzielt wurde (34,75%) wurde durch die Mutation allerdings nicht erreicht (Kap. III-2.1.3.2).

Die Anzucht von *R. capsulatus* B10S- $\Delta fabB$  in der Gegenwart von sowohl exogener Ölsäure als auch Cerulenin (Abb. III-23A, „mit Cerulenin“) führte ebenfalls zur Akkumulation der Ölsäure in der Membran (C18:1  $\Delta 9$ , orangene Fläche), führte aber nicht zu einem verstärkten Einbau der Fettsäure in die Membran, wie es bei Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 mit der gleichen Medienzusammensetzung beobachtet wurde (Abb. III-17).

Linolsäure wurde in Kulturen, die kein Cerulenin enthielten (Abb. III-23B, „ohne Cerulenin“) sehr effizient aus dem Kulturmedium aufgenommen und mit einem Anteil von 27,32% ( $\pm 1,25\%$ ) der Gesamtfettsäuren in die bakteriellen Membranen integriert (C18:2  $\Delta 9,12$ , braune Fläche). Dies entspricht der durch Cerulenin verstärkten Aufnahme der Linolsäure im Wildtyp *R. capsulatus* B10S-T7 (Abb. III-19).



Anders als beim Wildtyp-Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 konnte Linolsäure allerdings in Zellen, die in Gegenwart von freier Linolsäure und Cerulenin inkubiert wurden, nicht verstärkt in die Membranen eingebaut werden (Abb. III-23B, „mit Cerulenin“). Stattdessen erzielte diese Fettsäure einen gegenüber den nicht Cerulenin-inhibierten Kulturen deutlich verringerten Anteil der Linolsäure an den Gesamtfettsäuren von 18,08% (C18:2  $\Delta$ 9,12, braune Fläche). Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition von Cerulenin in diesen Kulturen den Einbau der exogenen Fettsäure in die Membran behindert.

Die Deletion des Gens *fabB* bewirkte in *R. capsulatus* eine deutliche Reduktion des Gehalts der ungesättigten Fettsäuren in der Membran sowie eine Erhöhung der Anteile der gesättigten Fettsäuren und der nicht eindeutig identifizierbaren kurzkettigen Komponenten. Wurden Kulturen dieser Mutante in der Gegenwart von Cerulenin inkubiert, wurden die durch Cerulenin ausgelösten Effekte (Reduktion der ungesättigten Fettsäuren und verstärkte Akkumulation gesättigter Fettsäuren) zusätzlich verstärkt.

Der Stamm *R. capsulatus*  $\Delta$ *fabB* war in der Lage, sowohl Ölsäure als auch Linolsäure als exogene Fettsäuren aufzunehmen und in die Membran zu integrieren. Ölsäure erreichte dabei einen Anteil von 19,55% der Gesamtfettsäuren und Linolsäure einen Anteil von 27,32%. Das bedeutete eine Verbesserung gegenüber der Aufnahme dieser Fettsäuren durch *R. capsulatus* B10S-T7 ohne die Einwirkung von Cerulenin. Im Gegensatz zu dem Wildtyp-Stamm konnte die Aufnahmeeffizienz von *R. capsulatus*  $\Delta$ *fabB* durch die Zugabe von Cerulenin zum Kulturmedium nicht weiter erhöht werden.

## 2.2 Heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* als heterologen Expressionswirt Fettsäure-modifizierender Enzyme zu nutzen. Für die ersten Experimente in diesem Kontext wurden acht Enzyme aus der Gruppe der Fettsäure-Desaturasen ausgewählt. Diese Enzyme katalysieren die Einführung von Doppelbindungen in die Kohlenstoffketten von Fettsäuren und dienen so der Produktion von einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Kap. I-1.3). Es wurden gezielt Vertreter dieser Enzymklasse ausgewählt, die verschiedenen Organismengruppen, Bakterien und Cyanobakterien, entstammen. Zudem unterscheiden sich die Enzyme in weiteren

Eigenschaften wie in der Substratspezifität und in der Position, in der die Doppelbindung in die Kohlenstoffkette eingefügt wird.

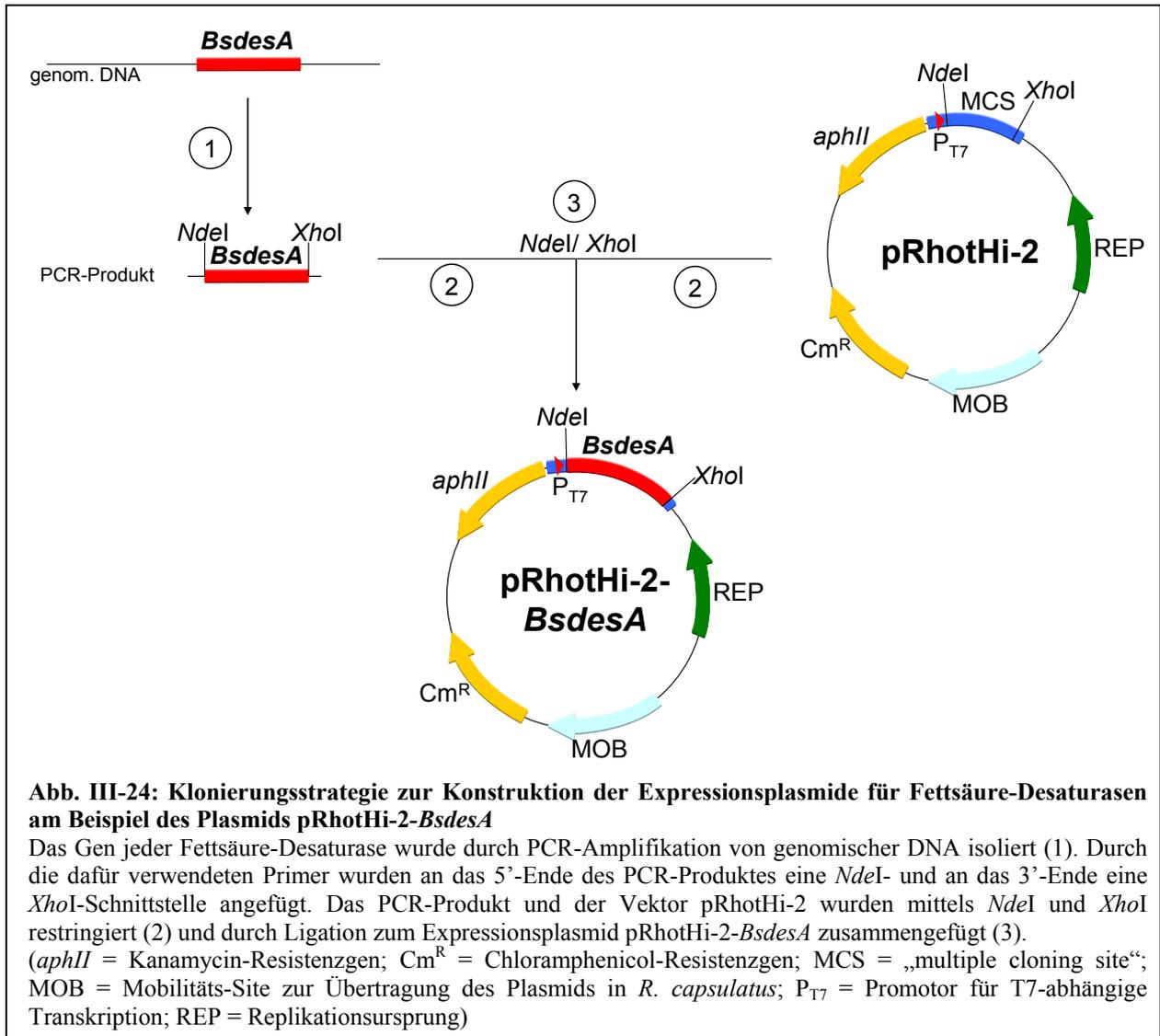
Die acht ausgewählten Fettsäure-Desaturasen und einige ihrer Charakteristika sind in Tab. III-2 zusammengefasst. Es handelt sich bei allen um membrangebundene Enzyme.

Bei *Synechocystis* und *Arthrospira platensis* (auch: *Spirulina platensis*) handelt es sich um Cyanobakterien. Die Enzyme werden von diesen Organismen zur Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet. Die Desaturasen von *Synechocystis* dienen dabei in diesem Organismus zur Produktion von C18-Fettsäuren, die bis zu vier Doppelbindungen in den Positionen  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  und  $\Delta 15$  tragen können, während in *Arthrospira* C18-Fettsäuren lediglich in den Positionen  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$  und  $\Delta 12$  desaturiert werden.

Die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Bacillus subtilis* zeichnet sich durch eine ungewöhnliche Desaturierungsposition ( $\Delta 5$ ) sowie eine niedrige Substratspezifität aus. Die *Stappia aggregata*-Desaturase wurde durch Homologievergleiche mit der Aminosäuresequenz der *B. subtilis* Desaturase gefunden. Daher sind die Eigenschaften dieser Desaturase noch nicht charakterisiert.

Tab. III-2: Übersicht über die zur heterologen Expression ausgewählten Fettsäure-Desaturasen

| Organismus   | Enzym | Substrat  | Position d. Doppelbindung | Erwartete Proteingröße | Kurzname |
|--|-------|---|---------------------------|------------------------|----------|
| <i>Synechocystis</i><br>PCC6803<br>(Cyanobacteria) | DesA  | C18:1 $\Delta 9$<br>C18:2 $\Delta 9,12$<br>C18:3 $\Delta 9,12,13$ | $\Delta 6$                | 38,6 kDa               | SyDesA   |
|  | DesB  | C18:2 $\Delta 9,12$<br>C18:3 $\Delta 6,9,12$                      | $\Delta 15$               | 39,4 kDa               | SyDesB   |
|  | DesC  | C18:0   | $\Delta 9$                | 34,9 kDa               | SyDesC   |
|  | DesD  | C18:1 $\Delta 9$<br>C18:2 $\Delta 6,9$                            | $\Delta 12$               | 39,4 kDa               | SyDesD   |
| <i>Arthrospira platensis</i> C1<br>(Cyanobacteria) | DesC  | C18:0   | $\Delta 9$                | 29,7 kDa               | ApDesC   |
|  | DesD  | C18:1 $\Delta 9$  | $\Delta 12$               | 40,7 kDa               | ApDesD   |
| <i>Bacillus subtilis</i><br>(Bacteria)             | DesA  | diverse, v. a.<br>C16:0<br>C18:1 $\Delta 11c$                     | $\Delta 5$                | 38,7 kDa               | BsDesA   |
| <i>Stappia aggregata</i><br>(Bacteria)             | DesA  | ?   | ?                         | 33,9 kDa               | SaDesA   |



Die Versuche zur heterologen Expression der Fettsäure-Desaturasen sollten sowohl in *E. coli* BL21(DE3) als auch in *R. capsulatus* B10S-T7 durchgeführt werden. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob die Enzyme in diesen Organismen funktionell exprimiert und in die Membranen des Expressionswirts eingebaut werden.

### 2.2.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Der erste Schritt zur heterologen Expression der ausgewählten Fettsäure-Desaturasen in *E. coli* und *R. capsulatus* bestand darin, geeignete Expressionsplasmide zu erzeugen. Da die Expression in beiden Organismen mittels eines T7-abhängigen Expressionssystems durchgeführt werden sollte, wurden Derivate des Plasmids pRhotHi-2 konstruiert, die jeweils

das Gen einer einzelnen der in Tab. III-2 aufgeführten Fettsäure-Desaturasen enthielten. In Plasmiden, die von pRhotHi-2 abgeleitet sind, wird das Zielgen hinter einen T7-abhängigen Promotor kloniert.

Eine Übersicht über die Klonierungsstrategie zeigt Abb. III-24 am Beispiel des Plasmids pRhotHi-2-*BsdesA*.

Das Gen für jede der ausgewählten Fettsäure-Desaturasen wurde durch PCR (Kap. II-11.7) mit spezifischen Primern (Kap. II-3) und chromosomaler DNA des Ursprungsorganismus als Template amplifiziert (Abb. III-24 ①). Die verwendeten Primer wurden dabei so konstruiert, dass am 5'-Ende des Gens eine *NdeI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt wurde. Über diese Schnittstellen wurden die Fettsäure-Desaturasen-Gene schließlich in das Plasmid pRhotHi-2 kloniert (Abb. III-24 ②, ③).

Alle Expressionsplasmide konnten erzeugt und die korrekte Insertion sowohl durch spezifische Restriktion der resultierenden Expressionsplasmide als auch die Sequenzierung der Insertionsregion bestätigt werden.

## **2.2.2 Heterologe Expression der Fettsäure-Desaturasen in *E. coli***

Die Expression der heterologen Desaturasen sollte zunächst in *E. coli* erfolgen. Damit wurden mehrere Ziele verfolgt. Zum einen diente diese Expression als Positivkontrolle für die Funktionalität der Expressionsplasmide. Zum anderen sollten durch diese Expressionsreihe ermittelt werden, unter welchen Expressionsbedingungen die maximale Ausbeute der heterologen Proteine erzielt werden kann. Des Weiteren wurden Lokalisationsstudien durchgeführt, um festzustellen ob die Fettsäure-Desaturasen, bei welchen es sich um normalerweise membranständige Enzyme handelt, auch nach der heterologen Expression in diesem Organismus in die Membranen von *E. coli* eingebaut werden.

### **2.2.2.1 Einfluss der Expressionszeit auf die Ausbeute heterologer Fettsäure-Desaturasen in *E. coli* BL21(DE3)**

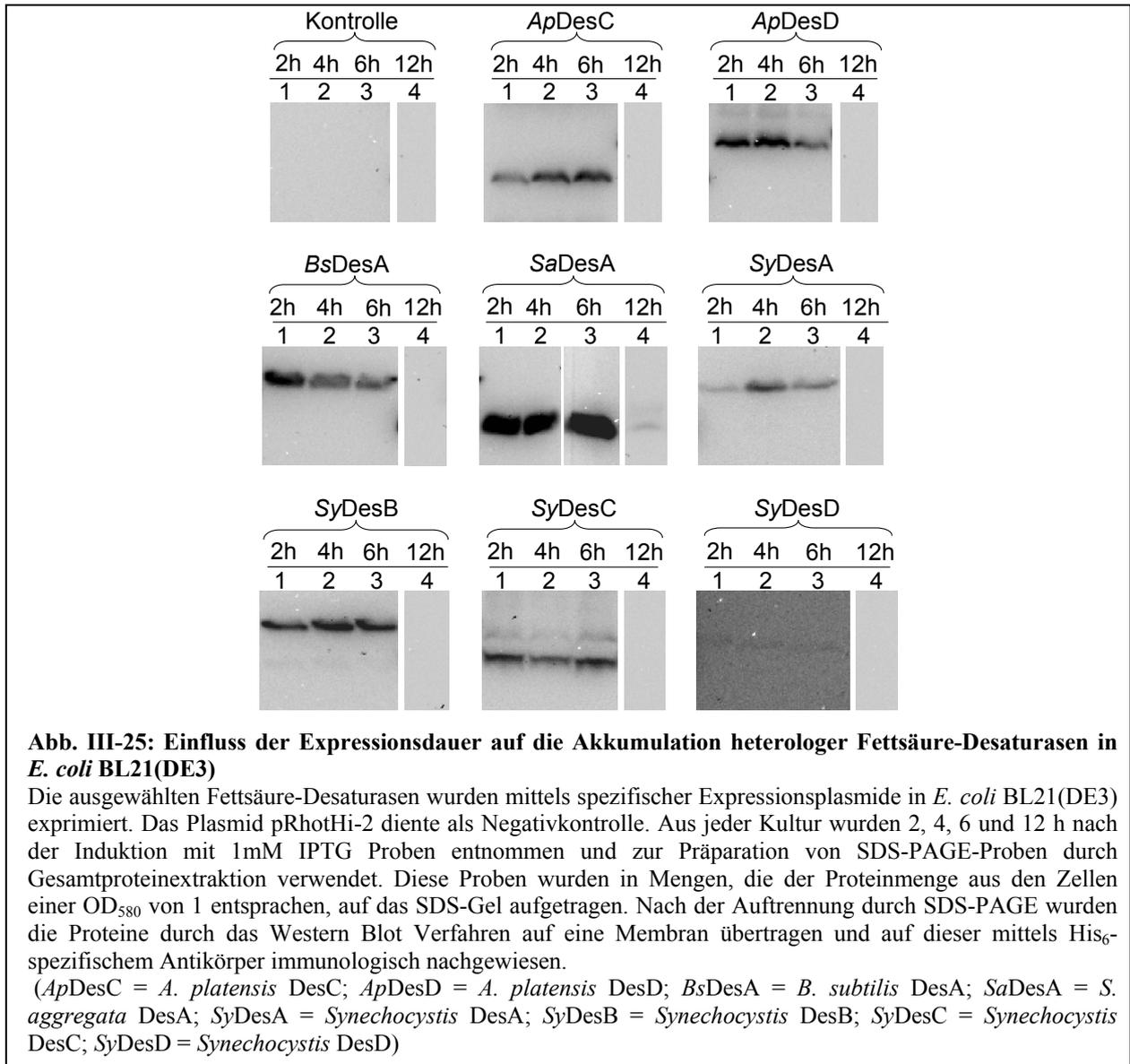
Die maximal erzielbare Ausbeute eines heterolog exprimierten Proteins wird von mehreren Faktoren bestimmt. Auf der einen Seite benötigen die an der heterologen Expression beteiligten Prozesse Zeit. Daher würde eine zu kurze Zeitspanne zwischen Induktion und

Zellernte dazu führen, dass das maximale Expressionspotential des Wirtes nicht ausgeschöpft wird. Auf der anderen Seite kann eine zu lange Expressionsphase die erzielten Proteinausbeuten wieder vermindern. So setzen zum Beispiel in der stationären Phase, bedingt durch den zunehmenden Mangel an Nährstoffen im Medium, vermehrt Abbauprozesse ein. Ab diesem Zeitpunkt kann sich die Wirkung von Proteasen stärker auswirken und dazu führen, dass die Ausbeute des Zielproteins wieder vermindert wird. Das bedeutet, dass auch eine zu lang gewählte Zeitspanne zwischen Induktion und Ernte der Zellen für eine effiziente heterologe Überexpression ungünstig sein kann.

Um nachzuweisen, inwiefern die Expressionsdauer bei der effektiven Überexpression heterologer Fettsäure-Desaturasen eine Rolle spielt, sollten die gewählten Fettsäure-Desaturasen (Tab. III-2) in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert und die Akkumulation des heterologen Proteins zu unterschiedlichen Zeiten nach der Induktion der Expression bestimmt werden.

Für die Expression der Desaturasen wurden Stämme von *E. coli* BL21(DE3) verwendet, die entweder als Negativkontrolle das leere Plasmid pRhotHi-2 oder eines der auf pRhotHi-2 basierenden Expressionsplasmide für die gewählten Fettsäure-Desaturasen (Kap. III-2.2.1) enthielten. Als Kulturmedium wurde 20 ml LB Medium mit Kanamycin (Kap. II-4.2) verwendet. Die Kulturen wurden mit einer  $OD_{580}$  von 0,025 aus Vorkulturen angeimpft und dann bis zu einer  $OD_{580}$  von 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Kap. II-10.1.1). An diesem Punkt wurde durch Zugabe von 1mM IPTG zum Medium die Expression der heterologen Gene induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion wurden 2 ml Probe, die Zellen geerntet und daraus durch Gesamtproteinextraktion Proben für SDS-Gele gewonnen (Kap. II-12.1). Mit den Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Kap. II-12.2), wobei die Auftragsmengen so gewählt wurden, dass jede Spur Gesamtprotein enthielt, das einer  $OD_{580}$  von 1 entsprach. Nach der Auftrennung durch die SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen (Kap. II-12.3). Da die heterologen Fettsäure-Desaturasen durch die Eigenschaften des Plasmids pRhotHi-2 mit einem His<sub>6</sub>-Tag fusioniert wurden, konnten sie mit spezifischem His<sub>6</sub>-Antikörper immunologisch nachgewiesen werden (Kap. II-12.4).

Das Ergebnis der heterologen Expression der Fettsäure-Desaturasen-Gene in *E. coli* BL21(DE3) ist in Abb. III-25 dargestellt.



In der Negativkontrolle („Kontrolle“) war wie erwartet keinerlei Protein nachzuweisen, während in allen anderen Proben Signale erschienen. Das zeigt, dass die im Folgenden beschriebenen Proteinbanden in der Tat den heterolog exprimierte Desaturasen entsprechen und nicht durch unspezifische Kreuzreaktionen mit organismuseigenen Proteinen hervorgerufen werden.

Alle untersuchten Fettsäure-Desaturasen konnten in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Die Signale entsprachen in allen Fällen den erwarteten Größen der betreffenden Proteine. Das beweist die Funktionalität der verwendeten Expressionsplasmide, da die T7-abhängige Expression effizient induziert und die Fettsäure-Desaturasen korrekt exprimiert wurden. Zudem zeigt sich dadurch die grundsätzliche Eignung dieser Enzyme, in einem heterologen Expressionswirt überexprimiert zu werden. Die Expressionseffizienz war unterschiedlich

hoch. Die schwächste Expression zeigte die *Synechocystis* Desaturase DesD („*SyDesD*“), so dass die Banden kaum mit bloßem Auge erkennbar waren. Die stärkste Expression war bei der *S. aggregata* Desaturase zu beobachten („*SaDesA*“), bei der die Intensität der Banden auf der Membran um ein Vielfaches höher war als für die übrigen Desaturasen. Für fast alle Desaturasen wurde die höchste Ausbeute vier Stunden nach der Induktion erreicht. Ausnahmen waren *B. subtilis* DesA („*BsDesA*“), *S. aggregata* DesA („*SaDesA*“) und *A. platensis* DesD („*ApDesD*“), welche effizienter als die übrigen Desaturasen akkumulierten und bereits nach zwei Stunden die maximale Ausbeute erreichten.

Bei einigen der untersuchten Enzyme („*ApDesD*“, „*BsDesA*“, „*SyDesA*“) wurde bereits sechs Stunden nach der Induktion eine deutliche Reduktion der Bandenintensität beobachtet, was darauf hindeutet dass zu diesem Zeitpunkt bereits der Abbau der heterolog exprimierten Proteine eingesetzt hatte. Zwölf Stunden nach der Induktion wurde nur noch bei der *S. aggregata* Desaturase („*SaDesA*“) eine geringe Menge des heterologen Proteins nachgewiesen, bei den übrigen Desaturasen war das nicht mehr möglich.

Alle heterologen Fettsäure-Desaturasen konnten erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Die Expressionseffizienz war dabei für *S. aggregata* DesA am höchsten und für *Synechocystis* DesA und DesD am niedrigsten. Grundsätzlich mussten allerdings für alle Fettsäure-Desaturasen relativ hohe Auftragsmengen gewählt werden, um sie auf den Membranen nachzuweisen, was auf eine generell niedrige Expressionseffizienz für diese Enzyme schließen lässt.

Die optimale Expressionszeit lag für die meisten der untersuchten Fettsäure-Desaturasen bei vier Stunden. Die einzigen Ausnahmen bildeten *BsDesA* mit einer optimalen Expressionszeit von zwei Stunden, sowie *SyDesC* mit einer optimalen Expressionsdauer von sechs Stunden.

Der schnelle Abbau des heterologen Proteins, der schon wenige Stunden nach der Expression einsetzte, deutet auf eine große Instabilität der Fettsäure-Desaturasen gegenüber den wirtseigenen Proteasen hin.

#### **2.2.2.2 Einfluss des Kulturmediums und des Expressionsstammes auf die Ausbeute heterologer Fettsäure-Desaturasen in *E. coli***

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Expression der heterologen Fettsäure-Desaturasen einen bedeutenden Einfluss auf die Proteinausbeute hat.

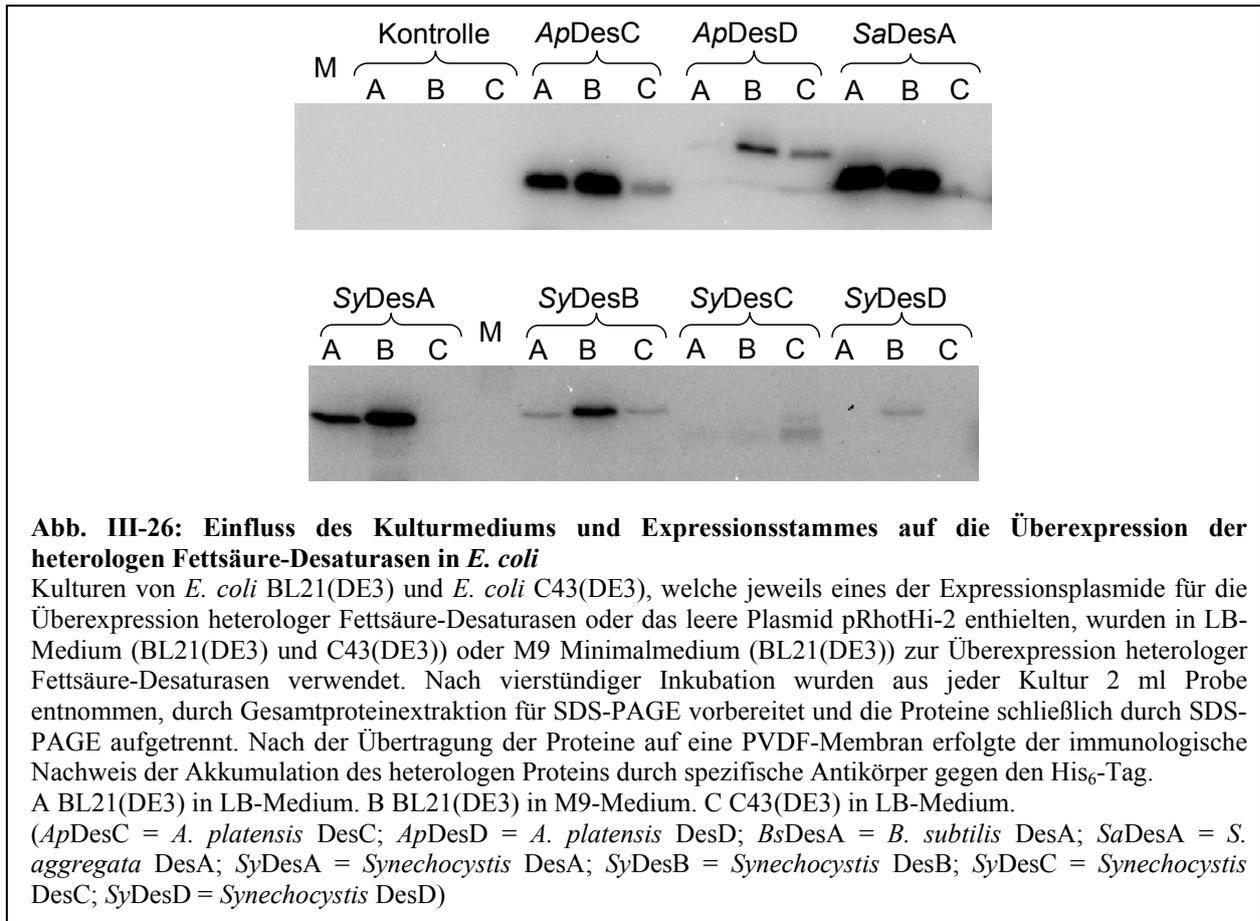
Weitere Faktoren, die die Expressionseffizienz beeinflussen können, sind das Kulturmedium und die Eigenschaften des gewählten Wirtsstammes.

Das Kulturmedium dient den Zellen als Quelle für Nährstoffe und Energie. In LB-Vollmedium stehen diese Komponenten im Überfluss zur Verfügung, während die Zellen in Minimalmedium nur die nötigste Versorgung erhalten. Da Mangelversorgung metabolischen Stress für die Zellen bedeutet, aus welchem wiederum eine geringe Effizienz der Überexpression resultieren kann, kann die Verwendung von Vollmedium manchmal zu besseren Ausbeuten eines heterolog exprimierten Proteins führen (Kap. I-2.1). Auf der anderen Seite besitzt Minimalmedium eine definierte Zusammensetzung. Im Folgenden sollte nun ermittelt werden, ob die Expressionseffizienz für heterologe Fettsäure-Desaturasen in LB-Medium (Vollmedium) oder M9-Medium (Minimalmedium) höher ist.

Des Weiteren sollte die Expressionseffizienz für heterologe Fettsäure-Desaturasen in zwei verschiedenen Stämmen von *E. coli*, BL21(DE3) und C43(DE3), verglichen werden. Bei beiden Stämmen handelt es sich um Stämme, welche die T7-abhängige Expression von heterologen Proteinen erlauben (Kap. I-4.1). Ein markanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen besteht darin, dass C43(DE3) Membraneinstülpungen ausbildet, durch welche die Oberfläche der Membran vergrößert wird. Die Membranoberfläche ist häufig ein limitierender Faktor bei der heterologen Überexpression von Membranproteinen (Kap. I-2.1). Da es sich auch bei den ausgewählten Fettsäure-Desaturasen um integrale Membranproteine handelt, könnte der Stamm *E. coli* C43(DE3) durch diese Eigenschaft besser für die Expression dieser Enzyme geeignet sein als *E. coli* BL21(DE3). Die Fettsäure-Desaturasen sollten daher in beiden Stämmen vergleichend exprimiert werden.

Die Vorgehensweise zur Expression der Fettsäure-Desaturasen in verschiedenen Kulturmedium und Expressionsstämmen war die gleiche wie bei den Untersuchungen zur Expressionsdauer (Kap. III-2.2.2.1). Für die Kontrollen wurden entsprechende Stämme verwendet, welche das Plasmid pRhotHi-2 ohne heterologes Gen trugen. Als Kulturmedien wurden sowohl LB-Vollmedium (BL21(DE3) und C43(DE3)) als auch M9-Minimalmedium (nur BL21(DE3)) verwendet (Kap. II-4.2). Die Probennahme erfolgte vier Stunden nach der Induktion der Expression. Der immunologische Nachweis der heterologen Fettsäure-Desaturasen ist in Abb. III-26 gezeigt.

Die Negativkontrollen, welche das leere Plasmid pRhotHi-2 trugen (Abb. III-26, Spuren 1-3), zeigten wie erwartet keine Banden von heterologem Protein.



In den Stämmen, die Expressionsplasmide für Fettsäure-Desaturasen enthielten, zeigte sich deutlich ein starker Einfluss der Wahl des Kulturmediums auf die Expressionsleistung der Zellen (Abb. III-26, Spuren A/ B). In fast allen Fällen akkumulierte in Kulturen, die in M9 Minimalmedium angezogen wurden, deutlich mehr heterologes Proteins als in Kulturen, die in LB-Medium gewachsen waren. Die einzige Ausnahme bildete die *S. aggregata* Desaturase („SaDesA“), welche in beiden Medien gleichermaßen effizient akkumulieren. Zwei der Fettsäure-Desaturasen („ApDesD“, „SyDesD“) waren nicht nachweisbar, wenn die Kulturen in LB-Medium inkubiert worden waren.

Die Expression der Fettsäure Desaturasen in dem Stamm *E. coli* C43(DE3) führte in fast allen Fällen zu einer deutlich geringeren Akkumulation der heterologen Enzyme, als es in BL21(DE3) beobachtet wurde (Abb. III-26, Spuren C). Bei den drei Fettsäure-Desaturasen SaDesA, SyDesA und SyDesD war in diesem Stamm das Protein kaum noch nachzuweisen. Nur eine einzige der Fettsäure-Desaturasen („SyDesC“) konnte in dem Stamm C43(DE3) effizienter akkumuliert werden als in BL21(DE3).

Die optimale Expressionsleistung wurde für die untersuchten heterologen Fettsäure-Desaturasen mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) in M9 Medium erzielt. Die Verwendung des Stamms *E. coli* C43(DE3) als Expressionswirt führte bei allen Fettsäure-Desaturasen mit Ausnahme von SyDesC zu deutlich verringerten Ausbeuten der heterologen Proteine.

### **2.2.2.3 Lokalisationsstudien zu heterologen Fettsäure-Desaturasen in *E. coli* BL21(DE3)**

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* Zellen, die ein Expressionsplasmid für eine der ausgewählten Fettsäure-Desaturasen tragen, das heterologe Protein nachgewiesen werden kann. Als nächstes sollte untersucht werden, wo das Protein in den Zellen akkumuliert.

Bei den untersuchten Fettsäure-Desaturasen handelt es sich um integrale Membranproteine mit mehreren Transmembranhelices (Kap. I-1.3). Diese stark hydrophoben Membrandomänen können bei heterologer Überexpression der betreffenden Enzyme Probleme bereiten. Bei zu starker Expression kann es bei Proteinen mit solchen Strukturen dazu kommen, dass die Translokationsmaschinerie der Zellen nur einen Teil des heterologen Proteins in die Membran einzubauen vermag und ein Großteil der Enzyme in unlöslichen Aggregaten („inclusion bodies“) abgelagert wird. Dies erschwert die Isolierung der heterologen Proteine aus den Wirtszellen und führt auch meist zu nicht funktionellen Enzymen (Kap. I-2.1).

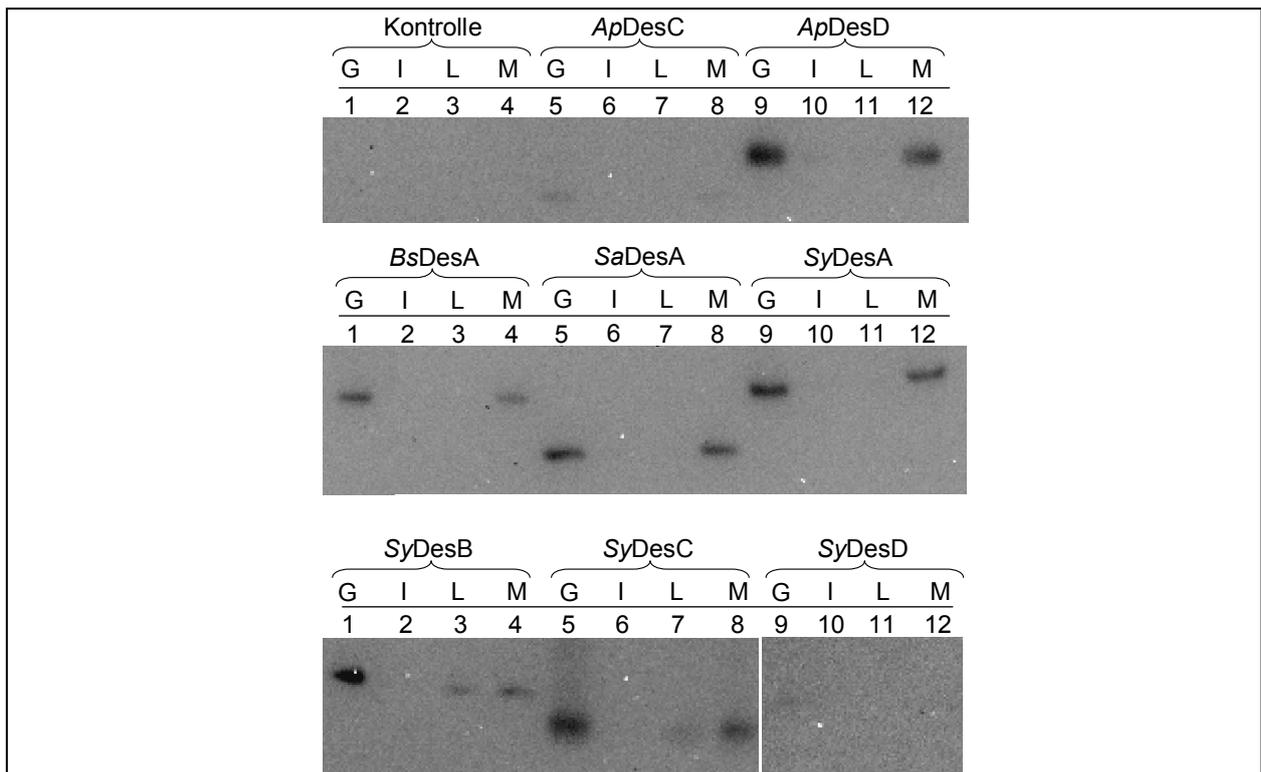
Um zu untersuchen, in welcher Form die untersuchten Fettsäure-Desaturasen bei heterologer Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) akkumulieren, sollten die verschiedenen Bestandteile der Zellen („inclusion bodies“, lösliche Proteine und Membranen) aufgetrennt und für jede Fraktion ein immunologischer Nachweis heterologer Fettsäure-Desaturasen durchgeführt werden.

Zur Überexpression der heterologen Fettsäure-Desaturasen wurde ebenso vorgegangen wie in den vorausgegangenen Versuchen (Kap. III-2.2.2.1). Die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3) erfolgte in einem Volumen von 100 ml. Nach Ablauf der vierstündigen Expressionszeit wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen (Kap. II-10.5), so dass anschließend die verschiedenen Zellfraktionen aufgetrennt werden konnten (Kap. II-10.6). Diese Fraktionen wurden dann mittels SDS-Gelen und Western Blot weiter untersucht, um die heterolog exprimierten Desaturasen zu lokalisieren (Kap. III-2.2.2.1).

In Abb. III-27 ist der immunologische Nachweis der heterolog exprimierten Fettsäure-Desaturasen in den Zellfraktionen von *E. coli* BL21(DE3) gezeigt.

In allen Kulturen, in denen der Wirtstamm eines der pRhotHi-2-basierten Expressionsplasmide für die heterologen Fettsäure-Desaturasen trugen, konnte wie erwartet heterologes Protein der jeweiligen Fettsäure-Desaturase im Gesamtprotein („G“) nachgewiesen werden. Zwei der Desaturasen, DesC von *A. platensis* (ApDesC; Abb. III-27 A, Spuren 5-8) und DesD von *Synechocystis* (SyDesD; Abb. III-27 C, Spuren 9-12) wurden allerdings nur sehr schwach exprimiert.

In keinem Fall ließ sich die untersuchte Fettsäure-Desaturase in der Fraktion der „inclusion bodies“ („I“) nachweisen. Das bedeutet, dass keine nachweisbaren Anteile der heterolog überexprimierten Enzyme unlöslich im Cytoplasma der Zellen verbleiben und deutet auf einen effektiven Einbau der Enzyme in die bakterielle Membran hin.



**Abb. III-27: Lokalisation heterologer Fettsäure-Desaturasen in *E. coli* BL21(DE3)**

In Kulturen von *E. coli* BL21(DE3), welche entweder ein Expressionsplasmid für eine Fettsäure-Desaturase oder das leere Plasmid pRhotHi-2 (Negativkontrolle) trugen, wurden die Fettsäure-Desaturasen in 100 ml M9 Minimalmedium exprimiert. Die Zellen jeder Kultur wurden aufgeschlossen und nach der Entnahme eines Aliquots aus dem Homogenisat die Bestandteile der Zellen durch Fraktionierung getrennt. Von jeder Fraktion wurden SDS-Proben präpariert. Nach der Auftrennung dieser Proben durch SDS-PAGE wurden die Proteine durch Western Blot auf Membranen übertragen und auf diesen durch immunologischen Nachweis des His<sub>6</sub>-Tags nachgewiesen.

(ApDesC = *A. platensis* DesC; ApDesD = *A. platensis* DesD; BsDesA = *B. subtilis* DesA; SaDesA = *S. aggregata* DesA; SyDesA = *Synechocystis* DesA; SyDesB = *Synechocystis* DesB; SyDesC = *Synechocystis* DesC; SyDesD = *Synechocystis* DesD; G = Gesamtprotein; I = „inclusion bodies“; L = lösliche Proteine; M = Membranfraktionen)

Für die Fettsäure-Desaturasen aus *A. platensis* (Abb. III-27 A, Spuren 5-12), *B. subtilis* und *S. aggregata* (Abb. III-27 B, Spuren 1-8) sowie die Desaturasen DesA und DesD aus *Synechocystis* (Abb. III-27 B, Spuren 9-12 und Abb. III-27 C, Spuren 9-12) konnte auch in den Proben der löslichen Proteine („L“) kein heterologes Protein nachgewiesen werden. Zwei Ausnahmen bildeten die Desaturasen DesB und DesC aus *Synechocystis* (Abb. III-27 C, Spuren 1-8). Diese beiden Fettsäuren akkumulierten in geringen Mengen auch in der Fraktion der löslichen Proteine. Dies ist für Membranproteine ungewöhnlich, da sie aufgrund ihrer hydrophoben Oberflächenstrukturen schlecht löslich sind.

Für fast jede Fettsäure-Desaturase konnte das heterologe Protein in den Proben der Membranfraktionen („M“) nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme war *Synechocystis* Desaturase DesD (Abb. III-27 C, Spuren 9-12). Da diese Fettsäure-Desaturase allerdings selbst in den Proben des Gesamtproteins („G“) nur in sehr geringer Menge akkumulierte, ist es möglich, dass bei den Präparationsschritten ein Anteil der Probe verloren ging, so dass die Nachweisgrenze des Proteins unterschritten wurde. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass auch bei allen anderen untersuchten Fettsäure-Desaturasen die Proteinmenge in den Membranfraktionen („M“) durch Verluste während der Präparation der Fraktionen geringer war als die Proteinmenge in den Proben des Gesamtproteins („G“).

Die heterolog exprimierten Fettsäure-Desaturasen werden in *E. coli* BL21(DE3) offenbar wie in den ursprünglichen Wirtsorganismen in die Membran der Zellen eingelagert.

#### **2.2.2.4 Aktivität von Fettsäure-Desaturasen nach heterologer Überexpression in *E. coli* BL21(DE3)**

In den vorangegangenen Experimenten konnte belegt werden, dass die ausgewählten Fettsäure-Desaturasen (Tab. III-2) in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert werden können und dass die heterologen Proteine in die Membranen der Bakterien eingebaut werden. Der nächste Schritt bestand darin, die Aktivität der heterologen Fettsäure-Desaturasen nachzuweisen.

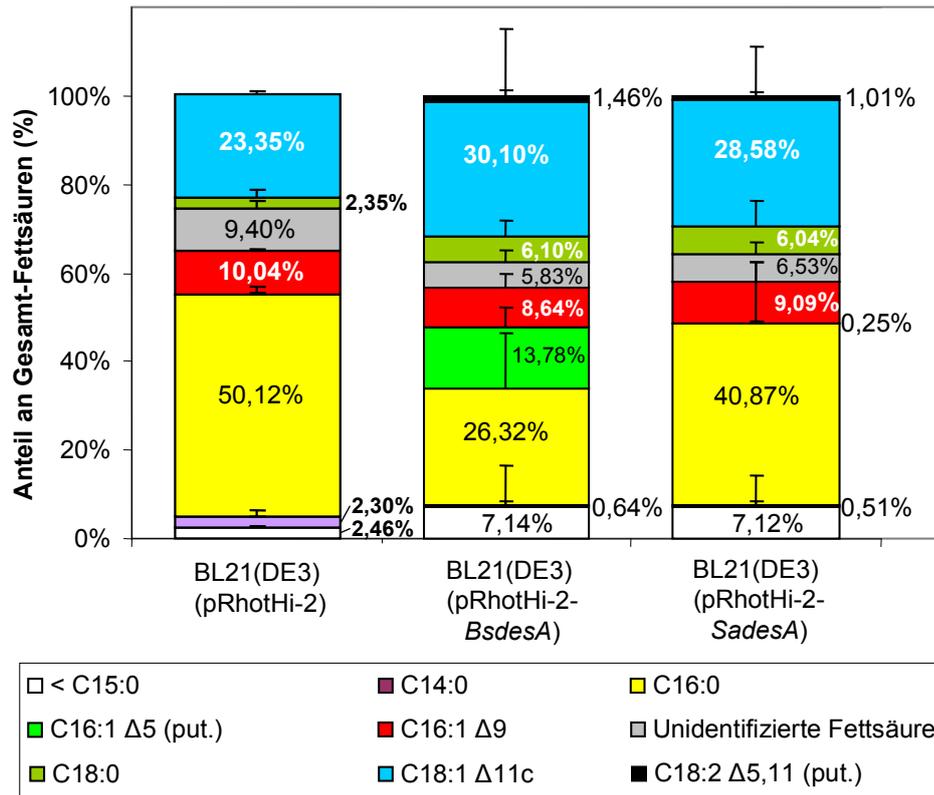
Die katalytische Reaktion von Fettsäure-Desaturasen besteht in der Umsetzung von phospholipidgebundenen Fettsäuren zu ungesättigten Derivaten dieser Fettsäuren durch Einführung einer Doppelbindung in spezifischer Position der Kohlenstoffkette (Kap. I-1.3).

Diese Umsetzung lässt sich durch Analyse der Fettsäuren-Zusammensetzung der Membranen des Expressionswirtes nachweisen: In Zellen, die aktive Fettsäure-Desaturasen exprimiert, würde die Menge des Substrats der jeweiligen Fettsäure verringert werden, und im Gaschromatogramm zusätzliche Signale mit der typischen Retentionszeit des Produktes der enzymatischen Umsetzung erscheinen.

Zur Analyse der Membranzusammensetzung von Fettsäuren-Desaturasen exprimierenden *E. coli* BL21(DE3) wurde die Expression der heterologen Enzyme durchgeführt wie schon zuvor beschrieben (Kap. III-2.2.2.1). Als Kulturvolumen wurden 600 ml gewählt. Abhängig von der exprimierten Fettsäure-Desaturase wurden dem Medium der Hauptkulturen gegebenenfalls Cerulenin (2 µg/ml) sowie eine exogene Fettsäure (75 µg/ml) zugefügt. Diese sollten dann durch die Zellen aufgenommen und in die bakterielle Membran integriert werden, um als Substrat für die betreffende Desaturase zu dienen (Tab. III-2). Nach vierstündiger Expression wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen (Kap. II-10.5), um dann die Membranfraktionen der Zellen durch Fraktionierung zu isolieren (Kap. II-10.6). Die Fettsäure-Zusammensetzung der Membranproben wurde dann analysiert wie bei den Versuchen zur Membranzusammensetzung von *R. capsulatus* B10S-T7 (Kap. III-2.1.1).

Nur nach der Expression von zwei der ausgewählten Fettsäure-Desaturasen, der *B. subtilis* Desaturase und *S. aggregata* Desaturase, konnten die Produkte der betreffenden Enzyme in der Membran von *E. coli* nachgewiesen werden. Die Analyse der Membranzusammensetzung beider Stämme ist in Tab. VII-13 (Anhang) und Abb. III-28 dargestellt. Bei den weiteren untersuchten Fettsäure-Desaturasen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Die Säule für BL21(DE3) (pRhotHi-2) zeigt die natürliche Membranzusammensetzung von *E. coli* unter den gewählten Expressionsbedingungen. Palmitinsäure (gelbe Fläche) bildete mit 50% Anteil an den Gesamtfettsäuren den Hauptbestandteil der Membran. Eine weitere bedeutende Komponente war *cis*-Vaccensäure (blaue Fläche), die fast ein Viertel der Membran einnahm. Palmitoleinsäure (rote Fläche) und eine nicht anhand des verwendeten externen Standards identifizierbare Fettsäure (graue Fläche) besaßen mit jeweils etwa 10% ebenfalls einen hohen Anteil an den Gesamtfettsäuren. Weitere Komponenten, die jeweils nur in geringen Mengen in der *E. coli* Membran enthalten sind, waren Stearinsäure (grüne Fläche), Myristinsäure (violette Fläche) und kurzkettige Komponenten mit Kettenlängen von 15 oder weniger C-Atomen (weiße Fläche).



**Abb. III-28: Veränderungen in der Membran von *E. coli* BL21(DE3) durch die heterologe Expression aktiver Fettsäure-Desaturasen**

Die Fettsäure-Desaturasen *BsDesA* und *SaDesA* wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen aufgeschossen und Membranfraktionen präpariert. Aus den Membranen wurden die Lipide extrahiert und die enthaltenen Fettsäuren in Methylester überführt, welche im Gaschromatographen analysiert wurden. Anhand der Peaks im Gaschromatogramm wurden die Fettsäurespezies identifiziert und die Ausbeuten und prozentualen Anteile der Fettsäuren in der Membran ermittelt.

Durch die Aktivität der *BsDesA* wurden in den Kulturen, die diese Fettsäure-Desaturase exprimierten, zwei neue Komponenten gebildet (Abb. III-28, „BL21(DE3) (pRhotHi-2-*BsdesA*)“). Beide konnten nicht anhand des verwendeten Standards identifiziert werden, allerdings wurde durch Vergleich mit der Literatur (Bonamore et al., 2006) festgestellt, dass es sich dabei wahrscheinlich um die erwarteten Produkte der *B. subtilis* Δ5-Desaturase, C16:1 Δ5 und C18:2 Δ5,11, handelt. Die vermutete C16:1 Δ5-Fettsäure erreichte dabei einen Anteil von mehr als 13% in der Membran, was die hohe Aktivität des Enzyms *BsDesA* belegt. Die Akkumulation erfolgte dabei ausschließlich auf Kosten des erwarteten Substrats der Desaturierungsreaktion, Palmitinsäure (C16:0), was wiederum belegt dass es sich bei der neuen Membrankomponente um C16:1 Δ5 handelt. Das zweite Produkt der *B. subtilis* Desaturase, C18:2 Δ5,11, welches durch Umsetzung von *cis*-Vaccensäure entsteht, wurde dagegen nur in Spuren akkumuliert. Dies entspricht allerdings den Erwartungen, da die *B.*

*subtilis*  $\Delta 5$ -Desaturase unter den hier verwendeten Expressionsbedingungen eine starke Präferenz für die Verwendung von C16:0 als Substrat hat (Bonamore et al., 2006).

Nach der Expression der *S. aggregata* Desaturase in *E. coli* BL21(DE3) (Abb. III-28, „BL21(DE3) (pRhotHi-2-*SadesA*) konnten ebenfalls Signale im Gaschromatogramm nachgewiesen werden, die nicht Bestandteil der natürlichen Membranzusammensetzung von *E. coli* BL21(DE3) waren. Gemäß den Retentionszeiten handelte es sich bei diesen Komponenten um dieselben Fettsäure-Spezies, die auch in den Kulturen von *E. coli* BL21(DE3) (pRhotHi-2-*BsdesA*) nachgewiesen wurden. Daher handelt es sich vermutlich ebenfalls um die Fettsäuren C16:1  $\Delta 5$  und C18:2  $\Delta 5,11$ . Das deutet darauf hin, dass es sich bei der bislang noch nicht charakterisierten Fettsäure von *S. aggregata* ebenfalls um eine  $\Delta 5$ -Fettsäure handelt. Beide Produkte akkumulierten allerdings nur in sehr geringen Mengen, was darauf hindeutet dass entweder die Expressionsbedingungen für die Desaturasenaktivität nicht optimal waren oder *S. aggregata* eine nicht in der Membran von *E. coli* vorhandene Fettsäure als Substrat bevorzugt.

Von den untersuchten Fettsäure-Desaturasen konnten die Desaturasen aus *B. subtilis* und *S. aggregata* in aktiver Form exprimiert werden. In beiden Fällen wurden jeweils zwei neue Fettsäurespezies in der Membran nachgewiesen, bei denen es sich vermutlich um die Fettsäuren C16:1  $\Delta 5$  und C18:2  $\Delta 5,11$  handelt. Dies sind die typischen Produkte der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *B. subtilis*, was darauf hindeutet, dass auch die *S. aggregata* Desaturase eine  $\Delta 5$ -Desaturasenaktivität besitzt. C16:1  $\Delta 5$  wurde in *B. subtilis* mit einem Anteil von 13,78% in der Membran nachgewiesen, während C18:2  $\Delta 5,11$  nur in geringen Mengen akkumulierte. Die *S. aggregata* Desaturase produzierte beide Fettsäurespezies jeweils nur in Spuren.

### **2.2.3 Heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus***

In *E. coli* BL21(DE3) konnten alle untersuchten Fettsäure-Desaturasen erfolgreich akkumuliert (Kap. III-2.2.2.1) und in die bakteriellen Membranen integriert werden (Kap. III-2.2.2.3). Die Fettsäure-Desaturasen *BsDesA* und *SaDesA* konnten genutzt werden, um die Umsetzung der membrangebundenen Fettsäuren zu katalysieren (Kap. III-2.2.2.4). Zudem konnten aus diesen Experimenten einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, wie verschiedene Kultivierungsbedingungen die Effizienz der Expression beeinflussen können.

Diese Erkenntnisse sollten nun auch für die Expression in *R. capsulatus* zur heterologen Überexpression der Fettsäure-Desaturasen angewendet werden.

Die ausgewählten heterologen Fettsäure-Desaturasen (Tab. III-2) sollten nun in dem T7-Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 unter beiden Wachstumsbedingungen exprimiert und die Akkumulation des heterologen Proteins durch immunologischen Nachweis belegt werden. Zudem sollte gegebenenfalls eine vorhandene Aktivität der exprimierten Fettsäure-Desaturasen *in vivo* nachgewiesen werden.

### **2.2.3.1 Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 unter phototrophen Expressionsbedingungen**

Die ausgewählten Fettsäure-Desaturasen (Tab. III-2) wurden als erstes unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen exprimiert.

Dazu wurden die Expressionsplasmide für Fettsäure-Desaturasen durch den Vorgang der Konjugation in *R. capsulatus* B10S-T7 übertragen (Kap. II-10.2). Die Expression erfolgte in 600 ml RCV-Minimalmedium mit Kanamycin (Kap. II-4.3) unter phototrophen Anzuchtbedingungen (Kap. II-10.1.2). Die Zellen wurden mit einer optischen Dichte bei 660 nm von 0,025 inokuliert und dann über Nacht inkubiert (zu einer OD<sub>660</sub> von 0,4 bis 0,6). Die Expression der heterologen Proteine wurde dann durch die Zugabe von 12mM Fruktose induziert. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden dann mit der French Press aufgeschlossen (Kap. II-10.5) und von dem Homogenisat 1 ml Probe entnommen („Gesamtprotein“). Das verbleibende Homogenisat wurde durch Zellfraktionierung (Kap. II-10.6) in die verschiedenen Bestandteile der Zellen aufgeteilt und an verschiedenen Stellen der Auftrennung Proben entnommen: von der Fraktion der löslichen Proteine wurde 1 ml Probe entnommen, die in Zellpellets konzentrierten Fraktionen der „inclusion bodies“ und Membranen wurden jeweils in 1 ml SP-Puffer resuspendiert. Von jeder Fraktion wurden Proben für SDS-Gele präpariert (Kap. II-12.1). Die Proteine in diesen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. II-12.2), wobei eine Probenmenge aufgetragen wurde, die dem Protein aus 1 ml Kultur einer Zelldichte von OD<sub>660</sub> von 3 entsprach. Anschließend wurden die Proteine durch Western Blot auf eine Membran übertragen (Kap. II-12.3), auf welchen das heterologe Protein durch immunologischen Nachweis mit His<sub>6</sub>-Tag-spezifischen Antikörpern detektiert wurde (Kap. II-12.4).

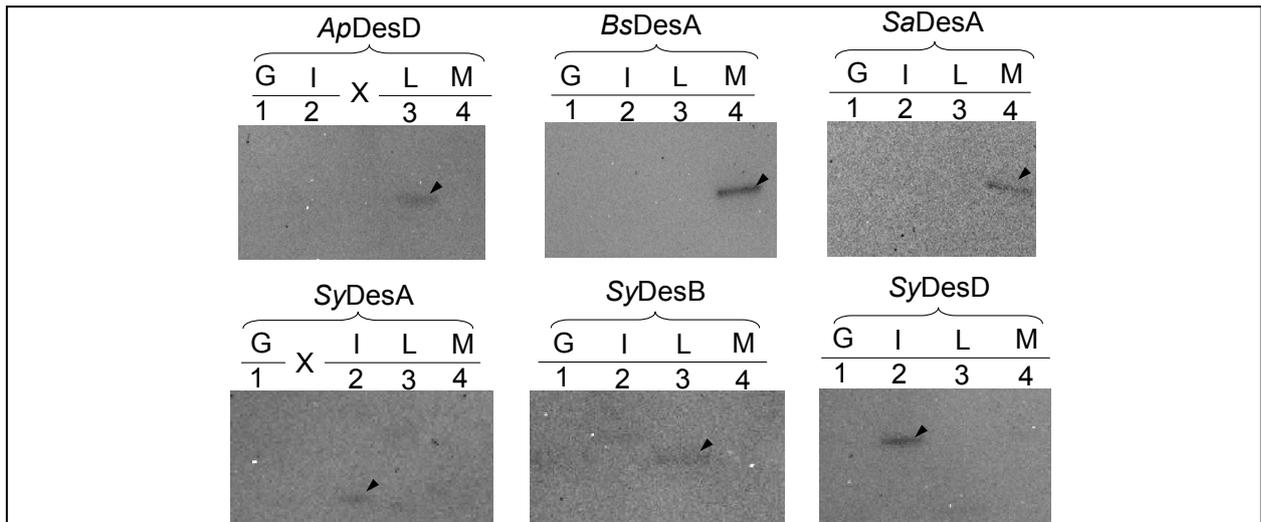
Abb. III-29 zeigt den immunologischen Nachweis heterologer Desaturasen nach der Expression in *R. capsulatus* B10S-T7.

Von den acht untersuchten Fettsäure-Desaturasen konnten nur sechs in *R. capsulatus* B10S-T7 unter phototrophen Bedingungen exprimiert werden. Weder *A. platensis* DesC noch *Synechocystis* DesC wurden mit nachweisbaren Ausbeuten akkumuliert. Die übrigen Desaturasen wurden im Vergleich zur heterologen Expression dieser Enzyme in *E. coli* nur mit schwacher Effizienz exprimiert (man beachte, dass die Auftragsmenge etwa dreimal höher gewählt war als in *E. coli*).

Die Lokalisation der exprimierten Fettsäure-Desaturasen war für jedes der Enzyme unterschiedlich. Die Desaturasen *A. platensis* DesD („ApDesD“) sowie die *Synechocystis* Desaturasen DesB („SyDesB“) wurden in der Fraktion der löslichen Proteine („L“) akkumuliert. Dagegen wurden zwei der Desaturasen aus *Synechocystis*, DesA („SyDesA“) und DesD („SyDesD“) als unlösliche Aggregate angereichert („I“). Nur zwei der heterologen Enzyme („BsDesA“, „SaDesA“) akkumulierten wie in den Ursprungsorganismen sowie nach der heterologen Expression in *E. coli* (Kap. III-2.2.2.3) in den Membranen der Zellen. Überraschenderweise konnten die heterologen Proteine in keinem Fall im Gesamtprotein detektiert werden.

Zwei der acht untersuchten Fettsäure-Desaturasen, DesC aus *A. platensis* sowie DesC aus *Synechocystis* konnten bislang auch in mehreren Versuchen nicht als heterolog exprimiertes Protein in den Kulturen nachgewiesen werden. Vermutlich lagen die Ausbeuten dieser Proteine unterhalb der Nachweisgrenze. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in *E. coli* BL21(DE3), in denen beide Enzyme heterolog überexprimiert werden konnten (Kap. III-2.2.2).

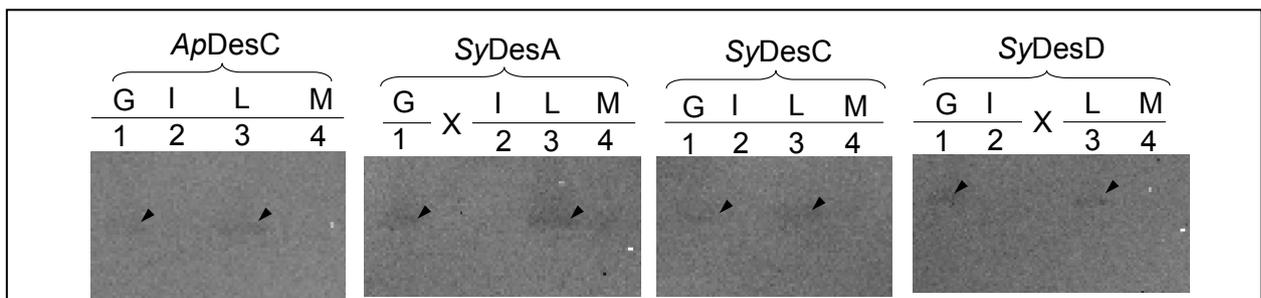
Die Desaturasen *ApDesD*, *BsDesA*, *SaDesA*, *SyDesA*, *SyDesB* und *SyDesD* konnten in *R. capsulatus* B10S-T7 unter phototrophen Bedingungen exprimiert werden. Im Vergleich mit der Expression in *E. coli* BL21(DE3) war die Expression in *R. capsulatus* allerdings nur schwach. Zudem akkumulierten nur *BsDesA* und *SaDesA* in den Membranen der Wirtszellen, während die übrigen Fettsäure-Desaturasen entweder in den Fraktionen der löslichen Fraktionen (*ApDesD* und *SyDesB*) oder der „inclusion bodies“ (*SyDesA* und *SyDesD*) nachgewiesen wurden.



**Abb. III-29: Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 unter anaeroben Bedingungen**

Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 mit jeweils einem der Expressionsplasmide für heterologe Fettsäure-Desaturasen wurden unter phototrophen Bedingungen in 600 ml RCV Minimalmedium mit Kanamycin kultiviert. Nach der Expression wurden die Zellen aufgeschossen und durch Fraktionierung in ihre Zellbestandteile aufgetrennt. Von allen Fraktionen wurden SDS-Proben bereitet und durch SDS-PAGE die Proteine in den Proben aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine Membran mittels Western Blot wurden die Proteine durch His<sub>6</sub>-Tag-spezifische immunologische Detektion nachgewiesen.

(ApDesD = *A. platensis* DesD; BsDesA = *B. subtilis* DesA; SaDesA = *S. aggregata* DesA; SyDesA = *Synechocystis* DesA; SyDesB = *Synechocystis* DesB; SyDesD = *Synechocystis* DesD; G = Gesamtprotein; I = „inclusion bodies“; L = lösliche Proteine; M = Membranen; X = Proteinstandard)



**Abb. III-30: Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 unter aeroben Wachstumsbedingungen**

Die heterologen Fettsäure-Desaturasen wurden in *R. capsulatus* B10S-T7 in 600 ml RCV Minimalmedium mit Kanamycin unter phototrophen Bedingungen exprimiert. Nach der vierstündigen Expression wurden die Zellen aufgeschossen und durch Fraktionierung in ihre Zellbestandteile aufgetrennt. Von diesen wurden SDS-Proben bereitet und durch SDS-PAGE die Proteine in den Proben aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und durch spezifischen immunologischen Nachweis des His<sub>6</sub>-Tags die heterologen Proteine detektiert.

(ApDesC = *A. platensis* DesC; SyDesA = *Synechocystis* DesA; SyDesC = *Synechocystis* DesC; SyDesD = *Synechocystis* DesD; G = Gesamtprotein; I = „inclusion bodies“; L = lösliche Proteine; M = Membranen; X = Proteinstandard)

### 2.2.3.2 Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 unter aeroben Expressionsbedingungen

Nach den Versuchen zur Expression der heterologen Fettsäure-Desaturasen (Tab. III-2) unter phototrophen Bedingungen sollten die Enzyme nun auch unter chemoheterotrophen Wachstumsbedingungen exprimiert werden.

Die Vorgehensweise dazu war die gleiche wie zur Expression unter phototrophen Bedingungen (Kap. III-2.2.3.1). Das Ergebnis der Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 ist in Abb. III-30 dargestellt.

Von allen untersuchten Fettsäure-Desaturasen konnten vier der Enzyme unter aeroben Bedingungen in *R. capsulatus* B10S-T7 exprimiert werden: aus *A. platensis* die Desaturase DesC („ApDesC“) sowie aus *Synechocystis* die Desaturasen DesA, DesC und DesD („SyDesA“, „SyDesC“, „SyDesD“). Dabei ist bemerkenswert, dass weder ApDesC noch SyDesC unter phototrophen Bedingungen in diesem Organismus exprimiert werden konnten (Kap. III-2.2.3.1). Die Expressionseffizienz war auch in diesem Experiment im Vergleich zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) sehr gering (Kap. III-2.2.2).

Alle erfolgreich exprimierten Fettsäure-Desaturasen wurden im Gesamtprotein („G“) und in den Fraktionen der löslichen Proteine („L“) nachgewiesen. Für *Synechocystis* DesA steht dies im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Expression dieser Desaturase unter phototrophen Bedingungen, da das heterologe Protein dort in der Form von „inclusion bodies“ akkumulierte (Kap. III-2.2.3.1). Keines der unter aeroben Bedingungen exprimierten Proteine akkumulierte in den Membranen der Zellen, wie es bei *E. coli* BL21(DE3) der Fall war (Kap. III-2.2.2.3).

Zwei Desaturasen, die unter phototrophen Bedingungen nicht exprimiert werden konnten, ApDesC und SyDesC, konnten unter aeroben Wachstumsbedingungen akkumuliert werden. Allerdings konnten mehrere der erfolgreich unter phototrophen Bedingungen exprimierten Fettsäure-Desaturasen (ApDesD, BsDesA, SaDesA und SyDesB) nach der Expression unter aeroben Wachstumsbedingungen nicht in den Proben nachgewiesen werden. Des weiteren akkumulierten die heterolog exprimierten Fettsäure-Desaturasen, die unter beiden Wachstumsbedingungen exprimiert werden konnten (SyDesA, SyDesD) in verschiedenen Fraktionen je nachdem, welche Bedingungen verwendet wurden. SyDesA und SyDesD akkumulierten in *R. capsulatus* bei phototropher Anzucht in „inclusion bodies“, bei aerober Anzucht allerdings in der Fraktion der löslichen Proteine.

### **2.2.3.3 Aktivität heterolog exprimierter Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7**

Nachdem ein Teil der untersuchten Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 exprimiert werden konnte und als heterologes Protein in diesem Organismus akkumuliert wurde (Kap. III-2.2.3.1, Kap. III-2.2.3.2), sollte als nächstes untersucht werden, ob das heterologe Protein in diesem Organismus auch in aktiver Form vorliegt und in der Lage ist, die Einführung von Doppelbindungen in die Kohlenstoffketten von Fettsäuren zu katalysieren. Dazu sollte die Aktivität der Desaturasen, die in aerob gewachsenen Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 exprimiert wurden, *in vivo* nachgewiesen werden.

Dazu wurden die Desaturasen wie zuvor unter aeroben Bedingungen in *R. capsulatus* B10S-T7 exprimiert (Kap. III-2.2.3.1). Dem Medium wurde bei den Stämmen, die eine Fettsäure-Desaturase exprimierten, deren Substrat in *R. capsulatus* nicht natürlich vorkommt, Cerulenin (2 µg/ml) und die als Substrat benötigte freie Fettsäure (75 µg/ml) zugesetzt. Im Anschluss an die Expression sollte die Membranzusammensetzung auf die Produkte der enzymatischen Umsetzung hin analysiert werden, um die Aktivität der Desaturasen zu überprüfen (Kap. III-2.1.1).

Es konnte leider für keine der untersuchten Fettsäure-Desaturasen Aktivität festgestellt werden.

### **2.2.3.4 Nachweis der Transkriptionseffizienz für Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* und *E. coli* durch RT-PCR**

Bei den Versuchen zur Expression heterologer Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* B10S-T7 (Kap. III-2.2.3.1, Kap. III-2.2.3.2) wurde beobachtet, dass diese Enzyme in diesem Organismus weitaus weniger effizient akkumulieren als in *E. coli* BL21(DE3) (Kap. III-2.2.2). Ein mögliches Problem für die effiziente Expression könnte in zu geringen Mengen mRNA in *R. capsulatus* im Vergleich zu *E. coli* bestehen, welche sowohl durch eine ungünstige Codon-Usage als auch durch zu raschen Abbau der mRNA verursacht werden kann.

Daher sollte der Level der mRNA für die heterologen Fettsäure-Desaturasen in den untersuchten Organismen verglichen werden. Dazu wurden aus Kulturen von *E. coli* und *R. capsulatus*, welche die besagten Enzyme exprimierten, am Ende der Expressionszeit jeweils 2 ml Proben entnommen. Für *R. capsulatus* wurden dabei Proben sowohl aus phototroph als aus

aerob angezogenen Kulturen entnommen. Aus den Proben wurde mRNA isoliert und mit dieser als Template eine Reverse-Transkriptase-PCR durchgeführt (Kap. II-11.8). Aus den ermittelten  $\Delta\text{Ct}$ -Werten, bezogen auf das Gen *rpoD* als Referenz, wurde das Verhältnis der Transkriptionseffizienz der Gene der Fettsäure-Desaturasen unter den verschiedenen Expressionsbedingungen ermittelt.

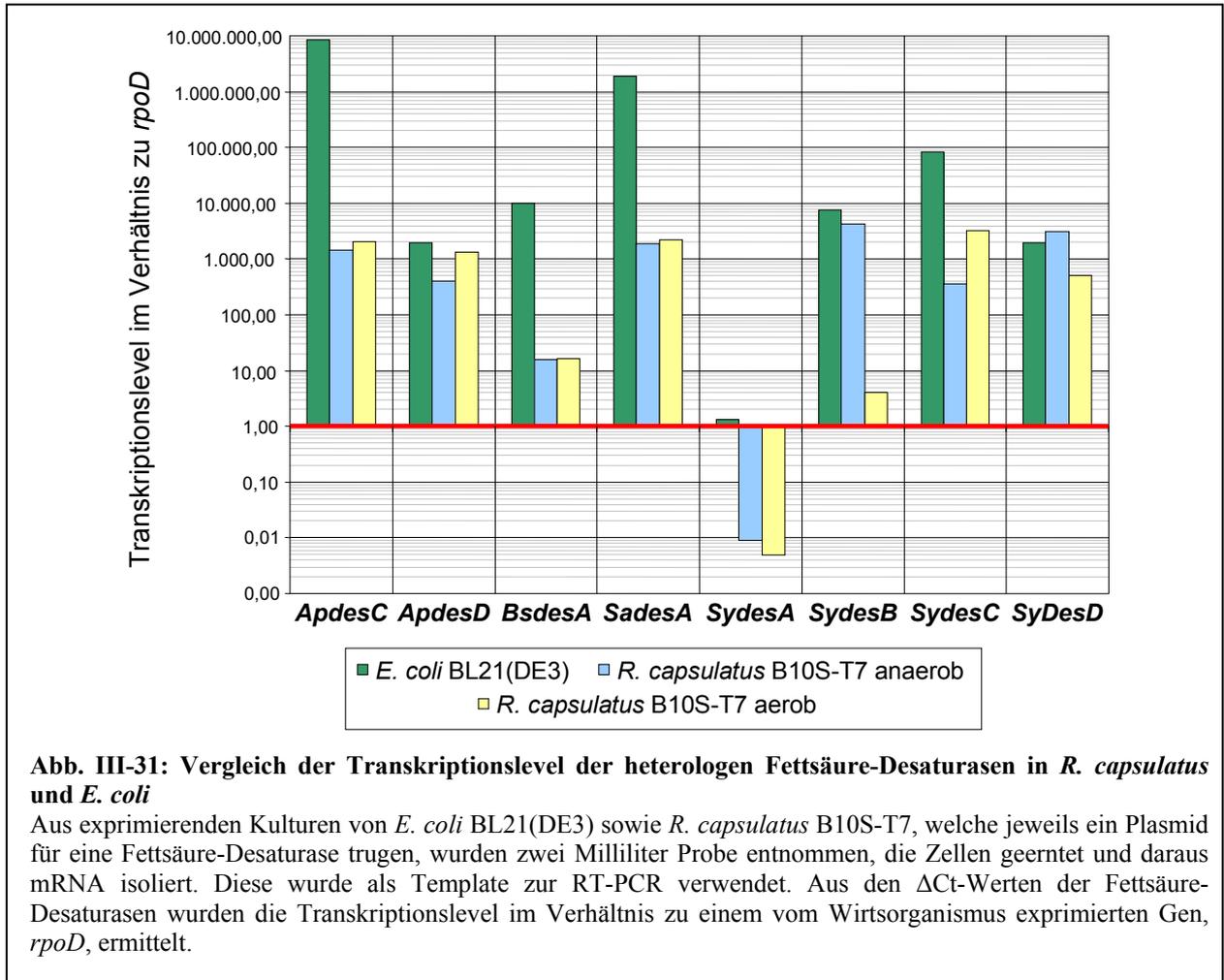
Dieses Verhältnis in den verschiedenen Expressionswirten ist in Abb. III-31 gezeigt.

Die rote Linie zeigt den Transkriptionslevel für das Gen *rpoD* an. Mit Ausnahme des Gens *SydesA* war die Transkription der Gene für die heterologen Fettsäure-Desaturasen deutlich höher als die Transkription von *rpoD*. Dies war zu erwarten, da RpoD in den Zellen auf physiologischem Level exprimiert wird, während die Fettsäure-Desaturasen überexprimiert werden sollten.

Der Vergleich der Transkriptionslevel ergab, dass die Gene der Fettsäure-Desaturasen *ApDesC*, *BsDesA*, *SaDesA* und *SyDesA* in *E. coli* BL21(DE3) um Faktoren von 500 bis zu mehreren Größenordnungen stärker transkribiert wurden als in den Kulturen von *R. capsulatus* B10S-T7, die dieselben Expressionsplasmide enthielten. Dies könnte die unterschiedliche Effizienz in der Expression in den verschiedenen Organismen erklären. Nur im Fall von *SyDesD* wurde in *R. capsulatus* eine etwas stärkere Akkumulation von Transkript beobachtet als in *E. coli*. Diese Desaturase wurde in *E. coli* und in aerob gewachsenem *R. capsulatus* allerdings dementsprechend mit vergleichbaren Ausbeuten exprimiert (Abb. III-25 und Abb. III-30), während die Ausbeute in *R. capsulatus* unter anaeroben Bedingungen etwas höher war (Abb. III-29).

Unter aeroben und anaeroben Bedingungen akkumulierte *R. capsulatus* für *ApDesC*, *BsDesA* und *SaDesA* vergleichbare Transkriptmengen. Bei der mRNA der übrigen Desaturasen wurden dagegen deutliche Unterschiede zwischen beiden Wachstumsbedingungen beobachtet. Für die Desaturasen *ApDesD* und *SyDesC* wurde unter aeroben Bedingungen mehr Transkript synthetisiert, für die Desaturasen *SyDesA*, *SyDesB* und *SyDesC* unter anaeroben Bedingungen.

|  |
|--|
| <p>Die Transkriptmenge war für alle Fettsäure-Desaturasen außer <i>SyDesD</i> in <i>E. coli</i> deutlich höher als in <i>R. capsulatus</i>. Dieser Unterschied im Level der mRNA könnte ein Grund für die geringe Expressionseffizienz in <i>R. capsulatus</i> sein.</p> |
|--|



## IV Diskussion

Das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* weist einige morphologische und physiologische Besonderheiten auf, durch welche es einen geeigneten Wirt für die Produktion ungewöhnlicher Fettsäuren und Phospholipide darstellen könnte. Als Modellenzyme für Fettsäure-modifizierende Enzyme sollten in dieser Arbeit Fettsäure-Desaturasen in diesem Organismus heterolog exprimiert werden (Kap. I-1.3.1). Um eine effiziente Expression dieser Enzyme zu gewährleisten, bestand der erste Schritt dieser Arbeit darin, die Expressionseigenschaften des gewählten Expressionsstammes, dem T7-Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7, näher zu charakterisieren und potentiell zu optimieren.

### 1 Die Expressionseigenschaften des Stammes *R. capsulatus* B10S-T7

In dieser Arbeit sollte zunächst das neue T7-Expressionssystem von *R. capsulatus* charakterisiert werden (Katzke, 2006; Katzke et al., 2010). Dieses Expressionssystem besteht aus zwei funktionellen Komponenten. Der Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase im Genom und ermöglicht daher die T7-abhängige Expression rekombinanter Zielgene. Die zweite Komponente besteht in einem „broad host range“ Expressionsplasmid, in dem das Zielgen unter der Kontrolle eines T7-Promotors steht. In diesem System steht das chromosomale Gen der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines Fruktose-abhängigen Promotors, der durch die Gegenwart von Fruktose im Medium induziert wird.

Durch die heterologe Expression des Reporterproteins YFP („yellow fluorescent protein“) sollten in dieser Arbeit die Expressionseigenschaften dieses Systems näher charakterisiert werden.

#### 1.1 Lässt sich die Expressionsleistung von *R. capsulatus* B10S-T7 durch die Induktorkonzentration modulieren?

Die heterologe Überexpression stellt hohe Anforderungen an die Ressourcen und den Energiehaushalt der Wirtszellen. Zudem kann die Überlastung der Faltungsmaschinerie der

Zellen zur Aggregation falsch gefalteter und damit inaktiver Enzyme führen (Baneux & Mujacic, 2004; Wagner et al., 2007; Freigassner et al., 2009). Ebenso kann die heterologe Überexpression von Proteinen, die sekretiert oder in die Membran eingelagert werden müssen, die Sekretionssysteme überlasten (Wagner et al., 2007; Chan et al., 2010). Alle diese Faktoren greifen in die Lebensprozesse der Zellen ein und können zu Schäden führen. So konnte etwa festgestellt werden, dass bei der Überexpression einiger Proteine die zelleigenen Proteine für die Respiration in geringerer Menge exprimiert wurden (Wagner et al., 2007). Diese Belastungen führen häufig zu verringerten Ausbeuten des heterologen Proteins.

Eine verringerte Expression des heterologen Zielgens kann diese Probleme oft abmildern oder vermeiden und so zu verbesserten Ausbeuten bei der heterologen Expression führen (Wagner et al., 2007; Freigassner et al., 2009). Dies kann zum Beispiel durch die Verwendung schwächerer Promotoren, verringerte Inkubationstemperaturen, Verwendung von Plasmiden mit niedriger Kopienzahl oder niedrige Induktorkonzentrationen erreicht werden (Freigassner et al., 2009; Sivashanmugam et al., 2009; Chan et al., 2010). Die Verwendung dieser Methoden führte dazu, dass einige schwer exprimierbare Proteine wie zum Beispiel IgG1 Antikörper (Chan et al., 2010), Glutaryl-7-Aminocephalosporinsäure-Acylase aus *Pseudomonas* (Volonté et al., 2008) und Penicillin G Acylase aus *Kluyvera citrophila* (Jiang et al., 2007) in *E. coli* exprimiert werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung niedriger Induktorkonzentrationen eine verringerte Ausbeute des Reporterproteins YFP erzielt wurde. Mit der niedrigsten untersuchten Fruktose-Konzentration von 4mM wurde unter beiden Bedingungen etwa eine halbmaximale Expressionsstärke beobachtet.

Dies kann zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass geringere Mengen Fruktose eine schwächere Induktion des *fru*-Promotors bewirken, unter dessen Kontrolle das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht. Dies würde in einer geringeren Expression der T7-RNA-Polymerase resultieren und so zu einer verringerten Ausbeute des YFP führen. Ein Beispiel für einen Promotor mit dieser Wirkungsweise ist der Promotor des *E. coli* L-Arabinose-Operons P<sub>BAD</sub> (Harmer et al., 2001). Das dimere Regulationsprotein AraC, das an diesen Promotor bindet, nimmt abhängig von der Zahl der gebundenen L-Arabinose-Moleküle verschiedene Konformationen ein und bewirkt so eine modulierte Induktion. Eine andere Erklärung für eine modulierte Expressionsleistung besteht darin, dass die verringerten Mengen des Induktors durch die Verteilung zwischen allen Zellen der Kultur nicht alle Promotoren erreichen und somit die verringerte Expressionsleistung darauf zurückzuführen ist, dass nicht alle Zellen der Kultur T7-RNA-Polymerase und damit YFP exprimieren. Dies

wäre zum Beispiel der Fall bei einem Regulator, der nur in den Stadien DNA-gebunden und nicht-DNA-gebunden vorliegt, wie etwa der *E. coli lac*-Repressor (Xu & Matthews, 2009).

Der Promotor  $P_{fru}$ , der die Expression des T7-RNA-Polymerase Gens in dem *R. capsulatus* T7-Expressionsstamm B10S-T7 kontrolliert, ist ein endogener Promotor dieses Organismus. Normalerweise vermittelt dieser Promotor die Expression des *fru*-Operons, welches für die Komponenten des Phosphotransferase-Systems kodiert, das der Aufnahme von Fruktose aus dem Kulturmedium dient (Daniels et al., 1988; Wu & Saier, 1990). In *E. coli* wird die Expression des analogen Operons durch den Repressor FruR reguliert, der sich durch die Bindung von aufgenommener Fruktose vom  $P_{fru}$  Promotor löst (Ryu et al., 1995; Gutierrez-Ríos et al., 2007; Ow et al., 2007). Der Mechanismus der Derepression ist allerdings bislang noch nicht untersucht, daher müsste für das T7-Expressionssystem in *R. capsulatus* B10S-T7 erst noch untersucht werden, durch welche Wirkungsweise die beobachtete graduelle Modulation der Expressionsleistung zustande kommt.

## 1.2 Welche Syntheseleistung kann mit *R. capsulatus* B10S-T7 erreicht werden?

Im vorangegangenen Kapitel wurde beschrieben, dass eine hohe Prozessivität eines Expressionssystems unter Umständen zu Problemen bei der heterologen Expression führen kann. Wenn aber Faktoren wie die Aktivität exprimierter Enzyme oder eine Aggregation in „inclusion bodies“ kein Problem darstellen, ist meist eine möglichst hohe Ausbeute der heterologen Proteine wünschenswert. T7-Expressionssysteme gelten generell als sehr leistungsstarke Systeme, da die T7-RNA-Polymerase ein sehr prozessives Enzym ist, dessen Transkriptionsleistung bis zu achtfach höher sein kann als die der *E. coli* RNA-Polymerase (Studier & Moffatt, 1986; Chevrier-Miller et al., 1990; Kochetkov et al., 1998).

In *R. capsulatus* B10S-T7 konnte durch die T7-abhängige Expression eine hohe Ausbeute des YFP erzielt werden. Der Stamm *R. capsulatus* B10S-T7 produzierte unter aeroben Bedingungen  $30,30\text{mg L}^{-1} \text{OD}^{-1}$  YFP und unter phototrophen Bedingungen  $80,27\text{mg L}^{-1} \text{OD}^{-1}$ . Damit war die Ausbeute unter phototrophen Bedingungen fast ebenso hoch wie in dem *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3). Dies belegt die hohe Prozessivität des *R. capsulatus* T7-Expressionssystems. Soweit bekannt, ist dies in einem photosynthetischen Bakterium die höchste bislang beobachtete Ausbeute eines heterolog exprimierten Proteins. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass das Bakterium *E. coli* bereits jahrelang als Wirt für heterologe Expression verwendet wird und vielfach auf eine verbesserte Proteinausbeute hin

optimiert wurde (Terpe, 2006), etwa durch die Deletion wirtseigener Proteasen (Makrides et al., 1996; Kandilogiannaki et al., 2001; Chen et al., 2004). Der T7-Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 dagegen basiert auf dem Wildtyp und besitzt außer dem ins Genom inserierten T7-RNA-Polymerase-Gen keine Elemente oder Mutationen, die auf eine erhöhte heterologe Expressionsleistung abzielen.

### **1.3 Welchen Effekt hat die Deletion von Proteasegenen auf die Überexpression in *R. capsulatus*?**

Die Proteolyse der synthetisierten Proteine ist ein bekanntes Problem bei der heterologen Expression, durch welches die Expressionseffizienz deutlich gemindert werden kann (Jensen et al., 2000). Neben der allgemeinen Aktivität der wirtseigenen Proteasen wird besonders bei Überexpressionen häufig beobachtet, dass als Antwort auf die Akkumulation des rekombinanten Proteins die Gene einiger Proteasen, insbesondere Lon und Clp, hochreguliert werden (Harcum & Bentley 1999; Ramírez & Bentley, 1999; Gill et al., 2000). Dies wird meist auf den mit der Überexpression verbundenen metabolischen Stress sowie die dabei häufig auftretende Aggregation der heterologen Proteine in „inclusion bodies“ zurückgeführt. Im Gegensatz zu *E. coli* wurde in *R. capsulatus* das proteolytische System und dessen Auswirkung auf die Akkumulation heterologer Proteine in diesem Organismus kaum untersucht. Durch Sequenzvergleiche mit Genen aus *E. coli*, die für Proteasen oder deren Untereinheiten kodieren, konnten in *R. capsulatus* allerdings mehrere Gene identifiziert werden, die zu den *E. coli* Genen *lon*, *hslV* und *clpP* homolog sind. Die betreffenden Gene kodieren für die Protease Lon sowie die proteolytischen Untereinheiten der Proteasen HslUV und ClpXP (Kap. I-2.1). Mittels sequenzspezifischer Interposonmutagenese wurden diese Gene deletiert und so proteasedefiziente Stämme von *R. capsulatus* erzeugt (Kreuz, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Deletionen in *R. capsulatus* bei der Expression von YFP um bis zu 78% erhöhte Ausbeuten dieses Proteins herbeiführten. Die Wirkung der Proteasen ClpP und HslV war dabei bei den gewählten Wachstumsbedingungen nahezu konstant. Die Wirkung der Deletion der Lon-Protease hing dagegen von den Wachstumsbedingungen ab. In phototroph gewachsenen Kulturen wurde ein stärkerer Effekt der Deletion beobachtet als bei aerob gewachsenen Kulturen. Das deutet darauf hin dass Lon in *R. capsulatus* vor allem unter phototrophen Bedingungen aktiv ist. Es ist allerdings auch möglich, dass der Effekt auf den Eigenschaften des YFP beruht, weil

dieses während der Chromatophorbildung relativ instabil ist (Andrews et al., 2008). Instabile Proteine zählen zu den bevorzugten Zielen der Lon-Protease (Van Melderen & Aertsen, 2009). Des weiteren erfolgte der Abbau des YFP in der *R. capsulatus* Lon-Mutante gegenüber den Wildtyp-Kulturen verzögert. Dies deutet darauf hin, dass die Lon Protease in der stationären Wuchsphase ihre höchste Aktivität besitzt, was bedeuten könnte, dass dieses Protein wuchsphasenabhängig exprimiert wird. Das könnte mit der Funktion der Lon Protease zusammenhängen, bei einem Mangel an Aminosäuren in der stationären Phase zelleigene Proteine zu degradieren (Kuroda, 2006).

Die Verwendung proteasedefizienter Stämme zählt in vielen mikrobiellen Expressionswirten zu den Standardmethoden, um die Ausbeute schwach exprimierter Proteine zu erhöhen, darunter *E. coli* (Kandilogiannaki et al., 2001; Jiang et al., 2002; Chen et al., 2004), *B. subtilis* (Westers et al., 2008), *Clostridium perfringens* (Tanaka et al., 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Groves et al., 1996; Copley et al., 1998) und *Schizosaccharomyces pombe* (Idiris et al., 2006). Anhand der heterologen Expression von YFP in proteasedefizienten Stämmen von *R. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass auch in diesem Organismus die Aktivität wirtseigener Proteasen einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute eines heterolog exprimierten Proteins haben kann. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit untersuchten proteasedefizienten Stämme sind weitere Verbesserungen des Expressionssystems von *R. capsulatus* denkbar, etwa die Erzeugung von Mehrfachmutanten oder die Deletion weiterer Proteasen.

Verschiedene Proteasen besitzen zum Teil die gleichen Substratspezifitäten, so dass die Deletion einer Protease mitunter durch die Aktivität einer anderen Protease kompensiert werden kann. So sind zum Beispiel die Proteasen Lon und HslUV in *E. coli* beide am Abbau von Sula, einem Regulator der Zellteilung, beteiligt (Wu et al., 1999). Die Erzeugung von Mutanten, in denen nicht nur eine, sondern mehrere Proteasen deletiert sind, könnte daher ein viel versprechendes Ziel für die weitere Erhöhung der Ausbeuten heterologer Überexpression in diesem Organismus sein (Copley et al., 1998; Chen et al., 2004; Idiris et al., 2006).

Des weiteren ist der proteolytische Degradationsapparat von *R. capsulatus* nicht vollständig untersucht. Die Suche nach weiteren Proteasen in diesem Organismus, deren Deletion ebenfalls zur Verbesserung der Ausbeute heterolog exprimierter Proteine beitragen kann, erscheint daher lohnend. Insbesondere wäre es eine wertvolle Erweiterung des Systems, wenn Proteasen ausgeschaltet werden könnten, die in verschiedenen Kompartimenten der Zellen aktiv sind (Jiang et al., 2002). Bei den hier untersuchten Proteasen Lon, HslUV und ClpXP handelt es sich um cytoplasmatische Proteasen, die möglicherweise keinen Einfluss auf

heterologe Proteine besitzen, die in der Membran oder im Periplasma angereichert werden. In *E. coli* sind eine Reihe membranständiger Proteasen bekannt, die auch in *R. capsulatus* existieren könnten, etwa die Proteasen RseP (Koide et al., 2008), OmpT (Jiang et al., 2002) sowie HtxP (Sakoh et al., 2005; Wagner et al., 2007). Des Weiteren existieren Proteasen, die spezifisch im Periplasma aktiv sind und daher Einfluss auf die Akkumulation periplasmatischer heterolog exprimierter Proteine besitzen können, darunter DegP, welche sowohl über eine proteolytische als auch eine Chaperon-Aktivität verfügt und vor allem gegen fehlgefaltete Proteine wirksam ist (Shen et al., 2009). Von den genannten Proteasen ist in *R. capsulatus* bislang nur die Protease DegP bekannt (Onder et al., 2008). Eine Untersuchung zur Identifikation weiterer Proteasen in *R. capsulatus* könnte dazu dienen, die Effizienz dieses Expressionssystems weiter zu steigern.

## **2 Assimilation exogener Fettsäuren aus dem Kulturmedium**

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der heterologen Expression von Fettsäure-Desaturasen als Vertreter der Gruppe der Fettsäure-modifizierenden Enzyme (Kap. I-1.3). Um die funktionelle Expression der Desaturasen zu überprüfen, sollten *in vivo* Expressionsstudien durchgeführt werden. Fettsäure-Desaturasen katalysieren die Einführung von Doppelbindungen in die Acylketten phospholipidgebundener Fettsäuren. Dabei zeichnen sich diese Enzyme meist durch eine hohe Substratspezifität aus. Die drei Desaturasen aus *A. platensis* zum Beispiel können jede nur eine bestimmte Fettsäure als Substrat umsetzen (Apiradee et al., 2004): *A. platensis* DesC verwendet ausschließlich Stearinsäure als Substrat, *A. platensis* DesD nur Ölsäure und *A. platensis* DesA nur Linolsäure. Das kann für die *in vivo* Umsetzung membrangebundener Fettsäuren ein Problem darstellen, da bakterielle Membranen nur eine begrenzte Anzahl verschiedener Fettsäuren enthalten. In *R. capsulatus* bestehen die Membranen der Zelle zu mehr als 80% aus *cis*-Vaccensäure, sowie zu geringeren Anteilen aus Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Stearinsäure (Kap. III-2.1.1), und enthalten damit nicht für alle Fettsäure-Desaturasen das notwendige Substrat. Um eine *in vivo* Umsetzung phospholipidgebundener Fettsäuren durch Desaturasen in *R. capsulatus* zu ermöglichen, ist es daher notwendig das Substratspektrum zu erweitern, indem wirtsfremde Fettsäuren in die Membranen der Zellen integriert werden. Es ist bekannt, dass Bakterien Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufnehmen (Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003; Schmelter et al., 2004) und in ihre Membran integrieren können (Buttke & Ingram, 1978;

Campbell & Lueking, 1983). In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob es auch in *R. capsulatus* möglich ist, die Zusammensetzung der bakteriellen Membran auf diese Weise zu modifizieren.

## **2.1 Kann *R. capsulatus* exogene Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufnehmen?**

Fettsäuren stellen in der Natur wichtige Verbindungen dar, die zur Energiegewinnung, als Kohlenstoff-Quelle, für regulatorische Prozesse und als Baustein für biologische Membranen verwendet werden können. Daher verfügen Bakterien über Aufnahmemechanismen für Fettsäuren (Schaffer, 2002; Schmelter et al., 2004). In *E. coli* beruht der Prozess des Fettsäure-Transportes, der auch in vielen anderen Bakterien konserviert ist (Black & DiRusso, 2003), auf zwei Mechanismen. Der Transport über die äußere Membran erfordert den Transporter FadL, während der Transport über die innere Membran sowohl freie Diffusion der Fettsäuren als auch die Acyl-Coenzym A-Synthetase FadD involviert (Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003; Schmelter et al., 2004). Die Diffusion ist ein weitgehend unspezifischer Prozess, der hauptsächlich von der Ladung der Fettsäuren abhängt (Hamilton, 1998; Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003). Die beiden am Transport beteiligten Enzyme sind dafür bekannt, eine Vielzahl von C14- bis C22-Fettsäuren als Substrate zu akzeptieren (Black & DiRusso, 2003; Morita et al., 2005). In *R. capsulatus* wurde die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Kulturmedium bislang noch nicht untersucht. Für den nahen Verwandten von *R. capsulatus*, *R. sphaeroides*, konnte allerdings nachgewiesen für verschiedene Fettsäuren von C14 bis C22 nachgewiesen werden, dass eine Aufnahme aus dem Kulturmedium möglich ist (Campbell & Lueking, 1983; Morita et al., 2005). Auch viele andere Bakterien sind dazu in der Lage (Buttke & Ingram, 1978; Scherer et al., 2003; Morita et al., 2005).

Durch die Anzucht von *R. capsulatus* B10S-T7 in der Gegenwart von *cis*-Vaccensäure, Ölsäure, Linolsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch dieser Organismus dazu in der Lage ist, exogene Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufzunehmen. Die aufgenommenen Fettsäuren wurden in die Membranen der Zellen integriert. Dieser Effekt wurde auch einer Reihe von anderen Organismen beobachtet (Buttke & Ingram, 1978; Campbell & Lueking, 1983; Morita et al., 2005).

Konjugierte Linolsäure, eine Isoform der Linolsäure mit einer veränderten Position der Doppelbindungen, konnte im Gegensatz dazu nicht effizient in die Membran von *R. capsulatus* eingebaut werden. Dies ist überraschend, da diese Verbindung sich von der Linolsäure nur in der Position einer Doppelbindung unterscheidet. Wegen der schon diskutierten geringen Spezifität der Aufnahmemechanismen für Fettsäuren (Hamilton, 1998; Schaffer, 2002; Schmelter et al., 2004) liegt dies vermutlich nicht daran, dass die Fettsäure nicht aufgenommen und ins Cytoplasma transportiert werden könnte. Dafür spricht auch, dass konjugierte Linolsäure in *R. capsulatus* eine Hemmung der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren auslöste, obwohl sie nicht in die Membran eingebaut wurde. Studien in *E. coli* zeigten, dass dieser Effekt durch Fettsäuren ausgelöst wird, die an Coenzym A gebunden wurden, was beim letzten Schritt des Transports geschieht (Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003; Schmelter et al., 2004). Die beobachtete Hemmung durch konjugierte Linolsäure lässt darauf schließen, dass diese mit Coenzym A verestert wurde, was bedeuten würde dass sie in die Zellen aufgenommen wurde. Ein mögliches Hindernis könnte der Einbau der konjugierten Linolsäure in die Phospholipide der Membran darstellen. Bisherige Studien zeigten, dass Fettsäuren, die dem Acyl-CoA-Pool zugefügt wurden, für die Synthese von Phospholipiden verwendet werden (Fujita et al., 2007; Zhang & Rock, 2008b). Es ist allerdings nicht untersucht, ob die dafür notwendigen Acyltransferasen (Zhang & Rock, 2008b) auch konjugierte Linolsäure als Substrat akzeptieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten darauf hindeuten, dass dies zumindest in *R. capsulatus* nicht der Fall ist.

Die Ergebnisse belegen, dass die Anzucht von *R. capsulatus* in der Gegenwart exogener Fettsäuren wie erwartet dazu dienen kann, wirtsfremde Fettsäuren in die Zellen einzubringen und so die Zusammensetzung der bakteriellen Membran zu modifizieren.

## **2.2 Welche physiologischen Effekte bewirkt die Aufnahme von Fettsäuren in der Zelle?**

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde beobachtet, dass die Gegenwart von Fettsäuren im Kulturmedium nicht nur zum Einbau der Fettsäuren in die bakterielle Membran führte, sondern zudem weitere Effekte hervorrief. Dazu zählten zusätzliche Veränderungen in der Membran sowie Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen.

Die Gegenwart von Fettsäuren im Medium bewirkte eine deutliche Reduktion der *cis*-Vaccensäure in der Membran sowie einen Anstieg des Gehalts gesättigter Fettsäuren. Diese

Effekte traten selbst dann auf, wenn die supplementierte Fettsäure nicht in die Membran der Zellen integriert wurde. Das deutet darauf hin, dass bereits die Gegenwart der Fettsäuren im Medium oder der Import in die Zellen eine Hemmung der zelleigenen Biosynthese ungesättigter Fettsäuren auslöst. In *E. coli* wird dieser Teil der Fettsäure-Synthese durch den Regulator FadR reguliert, der normalerweise als Aktivator an die Promotoren der Gene *fabA* und *fabB* bindet, die für die Synthese ungesättigter Fettsäuren unerlässlich sind (Zhang & Rock, 2008a). Beim Transport von Fettsäuren durch die innere Membran werden exogene Fettsäuren ausschließlich durch die Acyl-Coenzym A-Synthetase FadD aus der Membran extrahiert und dabei an Coenzym A gebunden (Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003; Schmelter et al., 2004). Die dadurch entstehenden langkettigen Acyl-CoAs binden an FadR und bewirken so, dass der Regulator sich von dem Promotor löst, wodurch die Transkription der beiden Gene inhibiert wird (Cronan & Subrahmanyam, 1998; Iram & Cronan, 2005; Zhu et al., 2009). Durch die Inaktivierung von FadR werden *fabA* und *fabB* weniger effizient transkribiert, und dadurch die Produktion ungesättigter Fettsäuren reduziert (DiRusso & Black, 2004; Zhang et al., 2006b; Zhu et al., 2009). Ob es in *R. capsulatus* ebenfalls einen FadR-homologen Regulator gibt, ist nicht bekannt. Es konnten allerdings *fadR*-homologe Gene in *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* und *V. alginolyticus* nachgewiesen werden (Raman et al., 1997; Cronan & Subrahmanyam, 1998). Die Kontrolle der Fettsäure-Biosynthese durch dieses Regulatormolekül könnte also ein unter Gram-negativen Bakterien verbreitetes Modell sein.

Eine weitere Beobachtung während der Versuche zur Aufnahme exogener Fettsäuren bestand darin, dass die Gegenwart der Fettsäuren im Medium eine leichte Verbesserung des Wachstums der Zellen bewirkte. Dies ist vermutlich auf die Verstoffwechslung der Fettsäuren in der  $\beta$ -Oxidation zurückzuführen (Zhang et al., 2006b; Nie et al., 2008). Die Gegenwart exogener Fettsäuren bewirkt die Aktivierung der Gene, die für die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzyme kodieren. In *E. coli* ist dafür der schon erwähnte Regulator FadR verantwortlich. Dieser wirkt zwar auf die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren als Aktivator, besitzt aber eine zweite Funktion als Repressor des *fad*-Regulons, welches die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Gene enthält (Cronan & Subrahmanyam, 1998). Durch die Bindung von Acyl-Coenzym A-Komplexen, wird auch in diesem Fall FadR von den Promotoren gelöst, die Gene somit dereprimiert und die  $\beta$ -Oxidation aktiviert (Cronan & Subrahmanyam, 1998; Iram & Cronan, 2005). Auf diese Weise können die Zellen die aufgenommenen Fettsäuren als Quelle von Kohlenstoff und Energie verwerten. Dies könnte die beobachtete Wachstumsverbesserung in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erklären.

Während einiger Versuche dieser Arbeit wurde das Wachstum der Zellen durch das Antibiotikum Cerulenin gehemmt. Die Zugabe von Ölsäure, Linolsäure oder *cis*-Vaccensäure ins Kulturmedium konnte in diesem Fall das Wachstum der Zellen zum Teil wieder herstellen, auf bis zu 75% des nicht inhibierten Wachstums. Dies ist vermutlich auf die Wirkungsweise von Cerulenin zurückzuführen: Das Antibiotikum inhibiert das Enzym FabB, welches an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt ist, und die dadurch entstehende Reduktion der Verfügbarkeit dieser Fettsäuren resultiert in der Wachstumshemmung (Zhang et al., 2006a). In *E. coli* (Buttke & Ingram, 1978) und *R. sphaeroides* (Campbell & Lueking, 1983) wurde beobachtet, dass diese Wachstumshemmung aufgehoben wird, wenn exogene Fettsäuren aufgenommen und in die Wirtsmembran eingelagert werden, da diese Fettsäuren Funktion der fehlenden endogenen ungesättigten Fettsäuren übernehmen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen den Schluss zu, dass dies offenbar auch in *R. capsulatus* geschieht.

### **2.3 Werden die aufgenommenen Fettsäuren in die Phospholipide der Bakterien eingebaut?**

Fettsäuren lagern sich leicht an Biomembranen und können zwischen die Phospholipide integrieren (Hamilton, 1998). Dies führt zu der Frage, ob die bei den Experimenten zur Aufnahme exogener Fettsäuren in den Membranfraktionen nachgewiesenen Fettsäuren tatsächlich in Phospholipiden verestert wurden oder ob es sich um freie Fettsäuren handelt, die ohne Bindung an Phospholipide in die Membran eingelagert sind.

In *E. coli* ist bekannt, dass die Acyltransferasen PlsB und PlsC, welche die Veresterung von Fettsäuren in Phospholipiden katalysieren, ebenso bereitwillig Acyl-CoA (das Produkt der Aufnahme exogener Fettsäuren; Schmelter et al., 2004) wie Acyl-ACP (das Produkt der zelleigenen *de novo* Biosynthese von Fettsäuren; Zhang & Rock 2008a) als Substrat verwenden (Zhang & Rock, 2008b). In Studien zur Aufnahme exogener Fettsäuren durch *R. sphaeroides* wurden die verschiedenen Phospholipidspezies aus den Membranen aufgetrennt und die in ihnen enthaltenen Fettsäuren identifiziert (Campbell & Lueking, 1983; Morita et al., 2005). Auf diese Weise wurde nachgewiesen, dass die aufgenommenen Fettsäuren in der Tat in die Phospholipide der Membran verestert wurden. Für *R. capsulatus* wurden solche Studien bislang nicht durchgeführt, aber aufgrund der engen Verwandtschaft der beiden Organismen ist es wahrscheinlich, dass solch grundlegende Mechanismen analog verlaufen.

Ein weiterer Hinweis sind die Ergebnisse der Assimilation exogener konjugierter Linolsäure, die als einzige der untersuchten Fettsäuren nicht in den Membranfraktionen der Zellen nachgewiesen werden konnte. Das ist ein markanter Unterschied zu den Ergebnissen zur gewöhnlichen Linolsäure, welche sehr effizient in die Membran integrierte. Die Einlagerung freier Fettsäuren in die Membran ist ein unspezifischer Prozess, der auf der hydrophoben Natur der Fettsäure-Acylkette beruht. Während Eigenschaften der Moleküle wie Kettenlänge oder die Anzahl und Lage von Doppelbindungen die Effizienz der Einlagerung beeinflussen können (Hamilton, 1998; Lewis & McElhaney, 2005), ist der Strukturunterschied zwischen gewöhnlicher und konjugierter Linolsäure nicht so groß, dass der enorme Unterschied in der Integrationseffizienz damit zu erklären wäre. Wenn in den Membranfraktionen nachgewiesene Fettsäuren also lediglich als freie Spezies in die Membran eingelagert würden, müsste konjugierte Linolsäure ähnliche Anteile in der Membran aufweisen wie gewöhnliche Linolsäure.

In *E. coli* werden in die Membran eingelagerte Fettsäuren, sobald sie durch einen Flip-Flop-Mechanismus auf die cytoplasmatische Seite der Membran gelangt sind, von der Acyl-Coenzym A-Synthetase FadD aus der Membran extrahiert (Schaffer, 2002; Black & DiRusso, 2003; Schmelter et al., 2004). Die bei diesem Prozess entstehenden Acyl-CoA-Moleküle bilden einen Pool, der in der Zelle verschiedene Funktionen erfüllt. Acyl-CoAs dienen als Signalstoffe, etwa zur Regulation der Fettsäure-Biosynthese und  $\beta$ -Oxidation, werden in der  $\beta$ -Oxidation verstoffwechselt und zur Synthese von Phospholipiden verwendet (Fujita et al., 2007; Zhang & Rock, 2008b). Ob diese Prozesse in *R. capsulatus* ähnlich ablaufen, wurde bislang noch nicht untersucht. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass die aufgenommenen Fettsäuren physiologische Effekte in der Zelle auslösen, wie die Hemmung der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren (Kap. IV-2.2). Wenn in *R. capsulatus* dem Transport und der Verwertung von Fettsäuren ein ähnliches System wie in *E. coli* zugrunde liegt, zeigen diese Ergebnisse, dass die untersuchten Fettsäuren in den Acyl-CoA-Pool gelangt sind, da sie nur in dieser Form die beobachteten physiologischen Effekte hervorrufen können. Der geringe Anteil der konjugierten Linolsäure, der in Membranfraktionen nachgewiesen wurde, könnte damit erklärt werden, dass dies der Anteil ist, der als eingelagerte freie Fettsäuren in der Membran verbleibt. Wenn diese Anteile für alle Fettsäuren vergleichbar sind, bedeuten die hohen Anteile der anderen Fettsäuren an den Membranfraktionen, dass sie aus dem Acyl-CoA-Pool entnommen und durch den Einbau in die Phospholipide der Membran wieder in diese zurückgeführt wurden.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass die aus dem Kulturmedium aufgenommenen Fettsäuren in *R. capsulatus* in die Phospholipide der Membran eingebaut werden, ist die Aufhebung des Wachstums-inhibierenden Effekts von Cerulenin durch die Supplementation mit exogenen Fettsäuren. Die Wiederherstellung des Wachstums ist nur möglich, wenn die aufgenommenen Fettsäuren die Funktion der in Cerulenin-inhibierten Zellen fehlenden ungesättigten Fettsäuren übernehmen können, insbesondere die Aufrechterhaltung der Membranfluidität. Zu diesem Zweck müssen die Fettsäuren stabil in die Membran integriert werden, was wegen der höheren Beweglichkeit freier Fettsäuren in der Membran besser durch Phospholipide gewährleistet wird als durch freie Fettsäuren.

#### **2.4 Welchen Effekt hat das Antibiotikum Cerulenin auf die Aufnahme exogener Fettsäuren durch *R. capsulatus*?**

Die Membranen von *R. capsulatus* besitzen mit mehr als 80% einen sehr hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren (Kap. III-2.1.1). Das könnte die Assimilation ungesättigter Fettsäuren aus dem Kulturmedium limitieren, wenn endogene und exogene ungesättigte Fettsäuren um den Einbau in die Membran konkurrieren und so die Effizienz der Integration fremder Fettsäuren reduzieren.

Daher wurde die Wirkung des Antibiotikums Cerulenin (Kap. I-1.2) auf *R. capsulatus* untersucht. In *E. coli* inhibiert dieses Antibiotikum spezifisch das Enzym FabB des Elongationszyklus der Fettsäure-Biosynthese, indem es eine kovalente Verbindung mit einem Cystein am aktiven Zentrum von FabB bildet. Dabei ragt die C<sub>12</sub>-Acylkette des Cerulenin in die hydrophobe Bindetasche des Enzyms, in der normalerweise die wachsende Acylkette untergebracht ist, und blockiert so die Substratbindung (Rock & Jackowski, 2002; Zhang et al., 2006a). Da es sich bei FabB um ein Enzym handelt, das an der Biosynthese ungesättigter, nicht aber an der Biosynthese gesättigter Fettsäuren beteiligt ist, wird auf diese Weise der Anteil endogener ungesättigter Fettsäuren in der Membran verringert. Dieser Effekt wurde auch in *R. capsulatus* beobachtet. Wenn der hohe Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran einen limitierenden Faktor für die Aufnahme und den Einbau exogener ungesättigter Fettsäuren darstellt, wäre zu erwarten dass eine Reduktion der endogenen ungesättigten Fettsäuren durch Cerulenin einen verstärkten Einbau exogener ungesättigter Fettsäuren bewirkt.

In Gegenwart von Cerulenin wurden Ölsäure und Linolsäure in der Tat effizienter aufgenommen. Die Anteile der wirtsfremden Fettsäure an den Gesamtfettsäuren der Membran stiegen auf jeweils mehr als die doppelte Menge mit 34,75% für Ölsäure und 38,25% für Linolsäure. Dieser verstärkende Effekt war auch schon bei Versuchen zur Aufnahme von exogenen Fettsäuren durch das verwandte Bakterium *R. sphaeroides* beobachtet worden (Campbell & Lueking, 1983), bei dem in Gegenwart der gleichen Konzentration von Cerulenin im Medium bis zu 29% Linolsäure in die Membran integriert werden konnten.

Eine überraschende Beobachtung bestand darin, dass höhere Cerulenin-Konzentrationen als 2µg/ml die Aufnahme von Ölsäure in die bakterielle Membran völlig verhinderten. Die Durchlässigkeit der bakteriellen Membran wird maßgeblich durch den Grad der Unsattheit der Fettsäuren der Membran bestimmt (Erand et al., 2005; Mansilla et al., 2008; Lundbaek et al., 2010). Eine Verringerung des Anteils ungesättigter Fettsäuren in der Membran verringert auch die Durchlässigkeit der Membran durch dichtere Packung der Acylketten der Fettsäuren, und kann so Transportprozesse wie die Aufnahme von Fettsäuren behindern. Dies ist ein wichtiger Faktor bei zukünftigen Experimenten zur Aufnahme von Fettsäuren aus dem Kulturmedium.

## **2.5 Welchen Effekt hat die Mutation $\Delta$ fabB auf *R. capsulatus*?**

In den vorangegangenen Versuchen zur Aufnahme von Fettsäuren durch *R. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass die Akzeptanz der Bakterien für wirtsfremde Fettsäuren durch die Gegenwart des Antibiotikums Cerulenin verbessert wurde. Die Verwendung von Cerulenin in den Kulturen ist allerdings in Bezug auf die Verwendung des Systems zur biotechnologischen Produktion von Fettsäuren und Phospholipiden aus zwei Gründen nicht wünschenswert. Zum einen würde der Preis des Antibiotikums die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens beeinträchtigen. Zum anderen müsste man abhängig von der Nutzung der Produkte, zum Beispiel für Nahrungsmittelzusätze, das Antibiotikum durch aufwändige Reinigungsverfahren aus der Biomasse entfernen. Daher könnte es von Vorteil sein, wenn es eine alternative Methode gäbe um den Effekt des Cerulenin hervorzurufen. Die Wirkung von Cerulenin besteht wie bereits erläutert in der Inhibition der  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase FabB und daraus resultierend in der Inhibierung der *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren (Kap. I-1.2). Die Deletion des Gens, das für das FabB-Enzym kodiert, sollte daher den gleichen Effekt wie Cerulenin hervorrufen. Daher wurden in dieser Arbeit weitere Versuche zur Aufnahme

exogener Fettsäuren mit einer *fabB*-Mutante von *R. capsulatus* (Gawarzewski, 2009) durchgeführt.

### **2.5.1 Wie wirkt sich die Mutation auf die Membranzusammensetzung von *R. capsulatus* aus?**

Die Deletion des Gens *fabB* bewirkte in *R. capsulatus* eine Reduktion des Gehalts der ungesättigten Fettsäuren in der Membran, sowie eine Erhöhung der Anteile der gesättigten Fettsäuren. Dies zeigt, dass wie erwartet durch die Mutation spezifisch die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren inhibiert wird. Nach dem Modell der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren in *E. coli*, spielt das Enzym FabB darin eine Schlüsselrolle (Zhang & Rock, 2008a). Die Beobachtung, dass in der *fabB*-Mutante von *R. capsulatus* die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beeinträchtigt ist, ist ein Hinweis darauf, dass das dieses Gen in *R. capsulatus* in der Tat für ein homologes Enzym zum *E. coli* FabB kodiert. Dafür spricht auch, dass das Fettsäure-Spektrum in der Membran von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* dem Muster in Zellen entspricht, die mit geringen Konzentrationen Cerulenin inhibiert wurden, den bei diesem Antibiotikum handelt es sich vornehmlich um einen Inhibitor des Enzyms FabB (Zhang & Rock, 2006a). Es wurde allerdings in den hier durchgeführten Experimenten gezeigt, dass der *cis*-Vaccensäure-Gehalt der Membran durch höhere Cerulenin-Konzentrationen weiter reduziert werden kann. Das deutet darauf hin, dass Cerulenin in diesen Konzentrationen nicht nur FabB inhibiert. Tatsächlich zeigten Studien zur Wirkung von Cerulenin in *E. coli* (Campbell & Cronan, 2001), dass Cerulenin in höheren Konzentrationen auch andere  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthetasen wie etwa FabF inhibieren kann.

Die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der *cis*-Vaccensäure durch die Mutation  $\Delta$ *fabB* in *R. capsulatus* entspricht nicht der Wirkung der Deletion des gleichen Gens in *E. coli*, welche dazu führt, dass die Bakterien keine ungesättigten Fettsäuren mehr produzieren können (Wang & Cronan, 2004). Dies deutet darauf hin, dass in *R. capsulatus* noch mindestens ein weiteres Enzym existiert, welches den Verlust der FabB-Aktivität zumindest zum Teil kompensieren kann. Dabei handelt es sich möglicherweise um das Genprodukt eines der beiden *fabF*-homologen Gene, die in *R. capsulatus* identifiziert wurden. Die Sequenzen der Gene *fabF1* und *fabF2* weisen jeweils etwas mehr als 50% Identität sowohl zu dem Gen *fabB* als auch zum jeweils anderen *fabF*-Gen auf (Gawarzewski, 2009). Die Gene *fabB* und *fabF* aus *E. coli* dagegen weisen nur etwa 38% Übereinstimmung miteinander auf (Rock & Cronan,

1996). Dies zeigt eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zwischen allen drei Genen in *R. capsulatus*, die möglicherweise ein Hinweis auf teilweise überlappende Funktionen darstellt. In *Lactococcus lactis* wurde festgestellt, dass das Enzym FabB dieses Organismus sowohl die Funktion von FabB als auch von FabF übernehmen kann (Morgan-Kiss & Cronan, 2008). Die *fabB*-Mutationsanalysen gewähren einen Einblick in die Fettsäure-Biosynthese von *R. capsulatus*, welche noch nicht eingehend untersucht wurde. Die Fettsäure-Biosynthese nach dem FASII-Mechanismus in *E. coli* (Kap. I-1.2) gilt als Modellsystem für die Biosynthese dieser Komponenten in Gram-negativen Bakterien (White et al., 2005; Zhang & Rock, 2008a). In *R. capsulatus* konnten durch Sequenzvergleiche eine Reihe von Genen entdeckt werden, die Homologien zu Genen der *E. coli* Fettsäure-Biosynthese aufweisen, darunter die Gene *fabA* (62,5% Identität mit dem entsprechenden Gen aus *E. coli*), *fabB* (63,6%) und *fabF* (54%) (Gawarzewski, 2009) sowie *fabH* (48%) und das an der Synthese der Phospholipide beteiligte *plsX* (33%) (Carty et al., 1994). FabH und PlsX aus *R. capsulatus* konnten in *E. coli* überexprimiert werden und PlsX dabei einen entsprechenden Defekt im Wirtsorganismus komplementieren. Die in *R. capsulatus* vorliegenden Ähnlichkeiten zum FASII-Syntheseweg von *E. coli* zeigen, dass in *R. capsulatus* Fettsäuren wahrscheinlich ebenfalls durch ein FASII-analoges System produziert werden. Es scheinen in diesem Organismus allerdings auch einige Abweichungen zu diesem System zu existieren. So wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Deletion des Gens *fabB* nur eine Reduktion des Anteils ungesättigter Fettsäuren in der Membran bewirkt. In *E. coli* dagegen sind *fabB*-Mutanten nicht in der Lage, ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren (Wang & Cronan, 2004). Des Weiteren ist bekannt, dass die Deletion des Gens *fabA* in *R. capsulatus* letal ist (Gawarzewski, 2009), während sie in *E. coli* nur die Synthese ungesättigter Fettsäuren unterbindet (Magnuson et al., 1993).

### **2.5.2 Wie wirkt sich die Mutation $\Delta fabB$ auf die Aufnahme exogener Fettsäuren durch *R. capsulatus* aus?**

Die Inhibition der zelleigenen Biosynthese ungesättigter Fettsäuren führt in *R. capsulatus* dazu, dass die Aufnahmeeffizienz für exogene Fettsäuren erheblich verbessert wird. Da die Mutation  $\Delta fabB$  ebenfalls eine Reduktion der *de novo* Biosynthese ungesättigter Fettsäuren bewirkt, sollte auch in dem Stamm *R. capsulatus* B10S- $\Delta fabB$  eine höhere Aufnahme dieser Komponenten erzielt werden können.

Der Stamm *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* war in der Lage, sowohl Ölsäure als auch Linolsäure als exogene Fettsäuren aufzunehmen und in die Membran zu integrieren. Dies zeigt, dass die Mutation nicht mit der Aufnahme exogener Fettsäuren interferiert. Ölsäure erreichte in der Membran einen Anteil von 19,55% der Gesamtfettsäuren und Linolsäure einen Anteil von 27,32%. Das bedeutete eine Verbesserung gegenüber der Aufnahme dieser Fettsäuren durch den Wildtyp *R. capsulatus* B10S-T7 ohne die Einwirkung von Cerulenin, wobei sie zu einem Anteil von 15% in die Membran eingebaut wurden. Die Mutation bewirkt also einen ähnlichen Effekt wie Cerulenin, konnte allerdings nicht die hohe Effizienz der Assimilation in Cerulenin-inhibierten Kulturen erreichen, in denen anschließend bis zu 37% dieser Fettsäuren nachgewiesen wurden. Dies zeigt, dass die Deletion die Produktion zelleigener ungesättigter Fettsäuren nicht vollständig verhindert. Es wurde bereits an anderer Stelle vermutet, dass es in *R. capsulatus* ein Enzym gibt, welches die Funktion von FabB in der Synthese ungesättigter Fettsäuren teilweise übernimmt, möglicherweise das *R. capsulatus* homologe Enzym zum *E. coli* FabF. Die durch Cerulenin bewirkte Steigerung der Effizienz der Integration exogener Fettsäuren in die Wirtsmembran könnte daher darauf beruhen, dass neben FabB auch FabF inhibiert wird.

Im Gegensatz zu dem Wildtyp-Stamm konnte die Aufnahmeeffizienz von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* durch die Zugabe von Cerulenin zum Kulturmedium nicht weiter erhöht werden. Es ist möglich, dass die kombinierte Wirkung der Mutation und des Cerulenin den Anteil der ungesättigten Fettsäuren in der Membran zu stark erniedrigen und dadurch die Aufnahme behindern.

Das Ziel, eine Mutante von *R. capsulatus* zu erzeugen, die keinerlei ungesättigte Fettsäuren in der Membran trägt und damit als verbesserte Grundlage zur Erzeugung von Stämmen mit wirtsfremden Fettsäuren in der Membran dienen kann, wurde leider nicht erreicht. Dennoch kann der Stamm *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ *fabB* nützlich zur Untersuchung der Wirkung Fettsäure-modifizierender Enzyme sein, da die Integrationseffizienz dieses Stammes höher war als im Wildtyp-Stamm, ohne dass dazu das teure und potentiell gesundheitsschädliche Antibiotikum Cerulenin verwendet werden musste.

Um die Assimilationseffizienz des Stammes B10S- $\Delta$ *fabB* weiter zu erhöhen, sind verschiedene weitere genetische Modifikationen denkbar. Eine Möglichkeit besteht darin, das vermutete Enzym zu identifizieren, welches die Funktion von FabB ersetzen kann, und dieses zu mutieren. Eine vollständige Deletion, durch die durch die Zellen selbst keine ungesättigten Fettsäuren mehr produziert werden können, wäre allerdings für diese Zwecke ungeeignet, da anhand höherer Cerulenin-Konzentrationen bereits gezeigt wurde, dass eine zu starke

Reduktion ungesättigter Fettsäuren in der Membran den Einbau exogener Fettsäuren völlig verhindert. Es wäre allerdings denkbar, durch Zufallsmutagenese Mutanten dieses Enzyms mit verringerter Aktivität zu erzeugen, und auf diese Weise die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren zu reduzieren, ohne sie völlig zu inhibieren. Eine alternative Lösungsstrategie basiert darauf, dass exogene Fettsäuren werden von Bakterien nicht nur als Baustein der Membran verwendet, sondern auch verstoffwechselt. Dadurch wird die Zahl der Fettsäuren, die zum Einbau in die Membran zur Verfügung stehen, verringert. Dem könnte durch eine Verringerung der Aktivität der Enzyme zur  $\beta$ -Oxidation, die für die Metabolisierung der Fettsäuren verantwortlich sind, entgegengewirkt werden. In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Mutante von *E. coli* mit mutierter  $\beta$ -Oxidation exogene Fettsäuren in höheren Mengen in die eigene Membran integrieren konnte als der Wildtyp (Morita et al., 2005).

### **3 Heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen**

Fettsäure-Desaturasen katalysieren die Einführung von Doppelbindungen in die Acylkette von Fettsäuren. Die dadurch entstehenden ungesättigten Fettsäuren sind von großer Bedeutung in der menschlichen Ernährung und stellen durch die hochreaktive Natur der Doppelbindungen exzellente Edukte zur Produktion einer Reihe von industriell relevanten Produkten dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen ob das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* dazu geeignet ist, als heterologer Expressionswirt von Fettsäure-Desaturasen und Produzent spezieller Phospholipide zu dienen. Dazu wurden sie zunächst in *E. coli* exprimiert, um ihre grundsätzlichen Expressionseigenschaften festzustellen und zu optimieren.

#### **3.1 Lassen sich heterologe Fettsäure-Desaturasen funktionell in *E. coli* exprimieren?**

Alle heterologen Fettsäure-Desaturasen konnten erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Die Enzyme waren in *E. coli* BL21(DE3) in den Membranen lokalisiert, während kein Protein in „inclusion bodies“ nachgewiesen wurde. Dies zeigt, dass die Enzyme effizient in die Wirtsmembranen integriert wurden. Die Expressionseffizienz der Fettsäure-Desaturasen

war allerdings relativ niedrig. Zusätzlich wurde bei einer Expression, die über vier Stunden Dauer hinausging, ein deutlicher Rückgang der Proteinausbeute beobachtet.

Dies deutet darauf hin, dass die heterologen Enzyme eine geringe Stabilität gegenüber den wirtseigenen Proteasen besitzen. Membranproteine, wie es Fettsäure-Desaturasen sind, sind gegenüber proteolytischer Degradation besonders anfällig, da sie zur Einbettung in die Membran auf eine korrekte Faltung und eine effiziente Translokation zur Membran angewiesen sind. Dauern diese Prozesse zu lange, sind die Enzyme zum einen länger der Wirkung cytoplasmatischer Proteasen ausgesetzt, und zum anderen kann es zu Fehlfaltungen kommen. Einige Proteasen wie etwa Lon und ClpXP sind dafür bekannt, insbesondere fehlgefaltete Proteine als Substrate zu erkennen und effizient abzubauen (Ades, 2004; Jackson et al., 2004; Van Melderer & Aertsen, 2009). Studien zur heterologen Expression der  $\Delta 12$ -Desaturase aus *Synechocystis* in *E. coli* (Panpoom et al., 1998) zeigten ebenfalls eine hohe Instabilität dieses Enzyms gegenüber proteolytischer Degradation. Zudem wurde bei der Desaturase DesA3 aus *Mycobacterium* beobachtet, dass das Enzym eine C-terminale Signalsequenz trägt, durch die der proteolytische Abbau begünstigt wird (Chang et al., 2008).

### **3.2 Sind die in *E. coli* exprimierten Fettsäure-Desaturasen aktiv?**

Leider konnten nach der heterologen Expression nur in zwei Fällen die Produkte der betreffenden Fettsäure-Desaturasen in der Membran von *E. coli* nachgewiesen werden, bei der *B. subtilis* Desaturase und bei der *S. aggregata* Desaturase.

Die *B. subtilis* Fettsäure-Desaturase setzte ihr bevorzugtes Substrat, Palmitinsäure (C16:0) (Diaz et al., 2002; Altabe et al., 2003), effizient in C16:1  $\Delta 5$  um. Die Anreicherung des Produktes zu 13,78% der Gesamtfettsäuren zeigt die hohe Aktivität dieses Enzyms. Ein zweites Produkt, C18:2  $\Delta 5,11$ , akkumulierte ebenfalls in geringen Mengen. Dies entspricht den Erwartungen bei den gewählten Expressionsbedingungen (Bonamore et al., 2006).

Die *S. aggregata* Desaturase wurde durch Sequenzvergleiche mit dem Gen der *B. subtilis* Desaturase entdeckt und bislang noch nicht näher charakterisiert. Die Homologie zur *B. subtilis* Desaturase führte zu der Vermutung, dass beide Desaturasen eine ähnliche Desaturierungsreaktion zeigen, also die Einführung einer  $\Delta 5$ -Doppelbindung in die Acylkette von Palmitinsäure und *cis*-Vaccensäure (Mansilla & de Mendoza, 2005; Bonamore et al., 2006). Die in Spuren nachgewiesenen Produkte der *S. aggregata* Desaturase entsprechen den Produkten der *B. subtilis* Desaturase. Das deutet darauf hin, dass die *S. aggregata* in der Tat

eine  $\Delta 5$ -Doppelbindung in Palmitinsäure (C16:0) und *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta 11c$ ) einfügen kann. Die Aktivität dieses Enzyms ist allerdings bedeutend geringer als die der *B. subtilis* Desaturase. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass die Expressionsbedingungen keine effiziente Umsetzung erlaubten, etwa aufgrund suboptimaler Reaktionstemperaturen oder Sauerstoffversorgung. Die *B. subtilis* Desaturase setzt zum Beispiel bei 37°C bevorzugt Palmitinsäure (C16:0) um, akzeptiert bei 20°C und zusätzlicher Begasung mit Sauerstoff allerdings auch *cis*-Vaccensäure (C18:1  $\Delta 11c$ ) als Substrat (Bonamore et al., 2006). Ebenso ist es möglich, dass die *S. aggregata* Desaturase trotz der Ähnlichkeit zu *B. subtilis* ein anderes bevorzugtes Substrat verwendet. Da in den Membranen der Kulturen keine neuen Produkte entstanden, müsste es sich dabei um eine Fettsäure handeln, die in dem heterologen Expressionswirt *E. coli* nicht vorkommt. Des Weiteren könnten für die Aktivität der *S. aggregata* Desaturase Kofaktoren oder Elektronendonoren erforderlich sein, die von *E. coli* möglicherweise nicht zur Verfügung gestellt werden. So enthält *E. coli* zum Beispiel nur sehr geringe Mengen Ferredoxin, welches von vielen Desaturasen als Elektronendonator verwendet wird (Kurdrid et al., 2007).

Die fehlende Aktivität der cyanobakteriellen Fettsäure-Desaturasen könnte auf die geringe Expressionseffizienz oder eine allgemein schwächere Aktivität dieser Enzyme zurückzuführen sein, so dass zwar eine Umsetzung phospholipidgebundener Fettsäuren stattfindet, aber aufgrund der geringen Proteinmengen die Produkte nicht in nachweisbaren Mengen produziert werden. Eine Abhängigkeit der Enzyme von der Gegenwart von Cofaktoren, die in *E. coli* unter Umständen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (Behrouzian & Buist, 2003; Kurdrid et al., 2007) ist als Grund auszuschließen, da von den hier untersuchten cyanobakteriellen Fettsäure-Desaturasen nur *Synechocystis* DesD einen Cofaktor (Eisen-Schwefel-Zentrum) für ihre Aktivität erfordert (Panpoom et al., 1998).

### **3.3 Lassen sich die Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* exprimieren?**

Auch in *R. capsulatus* B10S-T7 konnten alle Fettsäure-Desaturasen als heterologe Proteine akkumuliert werden. Für keine der exprimierten Fettsäure-Desaturasen konnte eine Aktivität nachgewiesen werden. Dies könnte allerdings in den geringen Expressionsleveln begründet sein. Eine weitere mögliche Erklärung liegt darin, dass die Enzyme möglicherweise nicht richtig gefaltet und aus diesem Grund nicht funktionell sind. Ein Hinweis darauf ist die Beobachtung, dass die Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* zum Teil in den löslichen

Fraktionen und „inclusion bodies“ akkumulierten. Die Aggregation in „inclusion bodies“ ist meist ein Zeichen für falsche Faltung (Wagner et al., 2007; Freigassner et al., 2009). Eine Akkumulation im Cytoplasma ist in diesem Fall ungewöhnlich, da es sich bei den Fettsäure-Desaturasen um Membranproteine handelt, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften entweder in die Membran integrieren oder in unlöslichen Aggregaten abgelagert werden sollten. Auch diese Beobachtung kann daher ein Zeichen dafür sein, dass die Faltung der Enzyme nicht korrekt erfolgte.

Die Expressionseffizienz für die Fettsäure-Desaturasen war in *R. capsulatus* gegenüber der Expression in *E. coli* BL21(DE3) deutlich verringert. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein starker proteolytischer Abbau sein. In *E. coli* wurde festgestellt, dass Fettsäure-Desaturasen einer starken proteolytischen Degradation unterliegen (Panpoom et al., 1998; diese Arbeit). Der Effekt könnte in *R. capsulatus* noch verstärkt sein, da in *E. coli* BL21(DE3) mehrere Proteasen ausgeschaltet wurden, um den Stamm für die heterologe Expression zu optimieren, während es sich bei *R. capsulatus* B10S-T7 um den Wildtyp handelt.

### **3.3.1 Ist die Expression der Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* auf der Ebene der Transkription oder Translation weniger effizient als in *E. coli*?**

Ein anderer Grund für die geringen Proteinausbeuten der heterologen Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* könnte in den Schritten der Transkription oder der Translation liegen. Wenn einer oder beide dieser Schritte in *R. capsulatus* weniger effizient verliefen als in *E. coli*, könnte dies die Unterschiede in der Akkumulation des heterologen Proteins erklären.

Um zu untersuchen, ob Limitationen auf der Ebene der Transkription die unterschiedliche Expressionseffizienz in *R. capsulatus* und *E. coli* verursachen können, wurden in dieser Arbeit die Transkriptmengen für die einzelnen Fettsäure-Desaturasen in beiden Organismen verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass in *R. capsulatus* weitaus weniger mRNA der Fettsäure-Desaturasen-Gene vorlag als in *E. coli*. Dies kann eine Erklärung für die geringeren Proteinausbeuten darstellen, da geringe Mengen mRNA eines Zielgens die Ausbeute eines heterologen Proteins limitieren. Ein möglicher Grund für geringe Transkriptmengen kann mangelnde Stabilität der mRNA sein (Jana & Deb, 2005; Sivashanmugam et al., 2009), durch welche die mRNA nach der Transkription rasch wieder abgebaut wird. Ein weiterer Faktor, der den Level der mRNA bestimmt, ist die Effizienz der Transkription, die von der Stärke des Promotors bestimmt wird. Während das *yfp*-Gen in beiden Expressionswirten *R. capsulatus*

B10S-T7 und *E. coli* BL21(DE3) unter der Kontrolle des T7-Promotors liegt, werden in beiden Systemen unterschiedliche Promotoren zur Expression der T7-RNA-Polymerase verwendet. Eine schwächere Aktivität des  $P_{frn}$ -Promotors (*R. capsulatus*) (Duport et al., 1994) im Vergleich zum *lacUV5*-Promotor (*E. coli*) (Terpe, 2006) könnte allerdings zu einer unterschiedlich effizienten Akkumulation der T7-RNA-Polymerase führen und damit zu unterschiedlichen Mengen mRNA der Fettsäure-Desaturasen-Gene führen. Die in dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Expression von YFP in *R. capsulatus* B10S-T7 und *E. coli* BL21(DE3) ergab allerdings annähernd gleiche Proteinausbeuten in beiden Stämmen. Dies beweist, dass die Promotorstärke in beiden Expressionsstämmen vergleichbar ist und die unterschiedliche Expressionseffizienz für Desaturasen-Gene in den Eigenschaften dieser Gene oder der von ihnen kodierten Enzyme begründet sind.

Ein weiteres mögliches Hindernis für eine hohe Ausbeute eines heterologen Proteins kann eine ineffiziente Translation sein. Dies wird häufig bei Genen beobachtet, deren Codon-Usage sich von der des verwendeten Expressionswirts unterscheidet (Kap. I-2.1). Abhängig von der Menge der kognitiven tRNA eines bestimmten Codons werden einige Codons als „selten“ definiert. Welche Codons selten sind, ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Eine große Anzahl dieser Codons in einem Gen führen dazu, dass diese geringe Menge schnell erschöpft wird und es zu Pausen in der Translation kommt. Dies kann die Expressioneffizienz erheblich vermindern (Gustafsson et al., 2004; Angov et al., 2008). Es ist bekannt, dass *E. coli* und *R. capsulatus* eine voneinander abweichende Codon-Usage verwenden (Wu & Saier, 1991). Daher ist es möglich, dass nicht beide Organismen gleich gut für die Expression der Fettsäure-Desaturasen geeignet sind.

**Tab. IV-1: Abweichung der wirtseigenen Codon-Usage von der Codon-Usage der ursprünglichen Wirte der Fettsäure-Desaturasen**

|               | <i>E. coli</i> | <i>R. capsulatus</i> |
|---------------|----------------|----------------------|
| <i>ApDesC</i> | 31,86%         | 46,63%               |
| <i>ApDesD</i> | 30,97%         | 38,3%                |
| <i>BsDesA</i> | 12,41%         | 23,39%               |
| <i>SaDesA</i> | 29,72%         | 20,7%                |
| <i>SyDesA</i> | 31,05%         | 34,72%               |
| <i>SyDesB</i> | 30,95%         | 41,53%               |
| <i>SyDesC</i> | 30,91%         | 41,7%                |
| <i>SyDesD</i> | 30,97%         | 38,3%                |

Die Sequenz einzelner Gene kann mit Hilfe von Codon-Usage-Tabellen für einzelne Organismen daraufhin untersucht werden, wie hoch der Anteil seltener Codons in Bezug auf die Codon-Usage bestimmter Organismen ist (Henry & Sharp, 2007; Roymondal et al., 2009). In Tab. IV-1 sind die Abweichungen der der Codon-Usage von *R. capsulatus* und *E. coli* von der Codon-Usage der Desaturasengene gezeigt. Für beide Expressionswirte ist die Codon-Usage dieser Gene nicht optimal. Die Abweichungen sind allerdings in *R. capsulatus* deutlich höher als in *E. coli*. Um dies weiter zu bestätigen, wurde mit allen Genen eine detaillierte Auswertung durchgeführt, bei der jedes Codon der Sequenz einzeln betrachtet wurde. Ein Beispiel für eine solche detaillierte Auswertung zeigen die Abb. VII-1 und Abb. VII-2 für *E. coli* und Abb. VII-3 und Abb. VII-4 für *R. capsulatus* anhand des Gens für die *A. platensis* Desaturase DesC. Die Befunde wurden für alle Gene der Desaturasen bestätigt. Die Auswertung ergab, dass die Gene für die Codon-Usage von *R. capsulatus* um ein Vielfaches mehr seltene Codons enthalten als für die Codon-Usage von *E. coli*. Zudem liegen die seltenen Codons in *R. capsulatus* häufig als „Cluster“ mehrerer Codons vor, durch die deren Effekt noch verstärkt wird (Kane, 1995; Kim & Lee, 2006; Chen et al., 2007). Des weiteren liegen für *R. capsulatus* fast immer auch mehrere seltene Codons nah am Start des Gens. Dies kann dazu führen, dass bei einer erzwungenen Pause die tRNA zusammen mit der kurzen Peptidkette vom Ribosom abfällt (Gonzalez de Valvidia & Isaksson, 2005; Delgado-Olivares et al., 2006). Dies bricht zum einen die Translation ab und mindert so die Expressionseffizienz, und zum anderen können diese kurzen Peptide toxische Effekte auslösen. Anhand dieser Befunde ist es wahrscheinlich, dass eine ineffiziente Translation aufgrund eines zu großen Teils seltener Codons in den Genen einen bedeutenden Beitrag zu der geringen Expressionseffizienz der Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* leistet.

Es existieren einige Strategien, um einer ungünstigen Codon-Usage entgegenzuwirken. Eine Möglichkeit besteht darin, die Gene für die kognitiven tRNAs der seltenen Codons auf Plasmiden zusammen mit dem heterologen Gen zu exprimieren (McNulty et al., 2003; Sørensen et al., 2003; Kim & Lee, 2006). Diese Strategie erlaubte zum Beispiel in *E. coli* die Überexpression der Glycin-Oxidase aus *B. subtilis* (Martínez-Martínez et al., 2006) sowie von drei Malariaenzymen (Christopherson et al., 2004). Eine Alternative besteht darin, die Codon-Usage des Gens an die Codon-Usage des Wirtes anzupassen, indem seltene Codons des Zielgens durch gezielte Mutationen in häufiger verwendete Codons überführt werden, die für die gleiche Aminosäure kodieren (Chang et al., 2006; Angov et al., 2008; Welch et al., 2009). Abhängig von der Anzahl der seltenen Codons kann dies durch Punktmutationen oder durch die Neusynthese des Gens mit optimierter Codon-Usage geschehen. Beispiele, in denen die

Codon-Optimierung von Genen in *E. coli* eine Verbesserung der Expressionseffizienz bewirkte, umfassen das Cry4Aa Protein von *Bacillus thuringiensis* (Hayakawa et al., 2008), das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (Wang et al., 2010) sowie den rekombinanten humanen Granulocyten-stimulierender Faktor (Krishna et al., 2008). Diese Strategien könnten auch genutzt werden, um die Expression der Fettsäure-Desaturasen in *R. capsulatus* zu verbessern. Aufgrund der Vielzahl der ungünstigen Codons erscheint allerdings nur eine Neusynthese der Gene mit optimierter Codon-Usage praktikabel.

## V Zusammenfassung

Fettsäuren und Phospholipide werden für eine Vielzahl von Anwendungen verwendet. Da eine chemische Synthese dieser Verbindungen nicht effizient möglich ist, werden sie vorwiegend mittels biotechnologischer Verfahren produziert. Besonders in der grünen Biotechnologie werden Fettsäure-modifizierende Enzyme vielfach zur Funktionalisierung von Fettsäuren eingesetzt, jedoch ist die dazu notwendige genetische Modifikation dieser Organismen schwierig. Alternativ können Mikroorganismen als Produzenten von Fettsäuren und Phospholipiden verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus* zum einen zur heterologen Expression von Fettsäure-Desaturasen und zum anderen zur Produktion wirtsfremder Phospholipide eingesetzt werden. Dazu wurden zunächst die Expressionseigenschaften des neuen T7-Expressionsstamms *R. capsulatus* B10S-T7 anhand der heterologen Expression des Reporterproteins YFP näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung steigender Induktorkonzentrationen die Ausbeute des heterologen Proteins graduell moduliert werden kann. Die maximal erzielten Ausbeuten in diesem Stamm betragen  $30\text{mg L}^{-1} \text{OD}^{-1}$  unter aeroben und  $80\text{mg L}^{-1} \text{OD}^{-1}$  unter phototrophen Bedingungen. Zusätzlich konnte die Ausbeute von YFP in *R. capsulatus* B10S durch die Deletion der wirtseigenen Proteasen Lon, ClpP und HslV erhöht werden. Um als Substrat für Fettsäure-modifizierende Enzyme wirtsfremde Fettsäuren in die Membran von *R. capsulatus* zu integrieren, wurden die Zellen in der Gegenwart von Fettsäuren im Kulturmedium inkubiert. Ölsäure, Linolsäure, *cis*-Vaccensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, aber nicht konjugierte Linolsäure, konnten in die Wirtsmembran integriert werden. Die Aufnahmeeffizienz für Ölsäure und Linolsäure konnte durch die Inhibierung der Biosynthese wirtseigener ungesättigter Fettsäuren weiter verbessert werden. Durch die Optimierung wurden Anteile der wirtsfremden Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren der Membran von bis zu 37% erzielt. Abschließend konnte durch die heterologe Expression von Fettsäure-Desaturasen gezeigt werden, dass diese Enzyme in *E. coli* BL21(DE3) akkumulieren. Eine Begrenzung der Expressionszeit auf vier Stunden war essentiell für eine hohe Ausbeute. Aktivitätsanalysen zeigten, dass nur die Desaturasen aus *Bacillus subtilis* und *Stappia aggregata* in aktiver Form exprimiert wurden. In *R. capsulatus* wurden hingegen nur geringe Mengen des heterologen Proteins synthetisiert und keine Aktivität nachgewiesen. Die durchgeführten Arbeiten konnten allerdings mögliche Limitierungen für zukünftige Versuche zur heterologen Expression von Fettsäure-Desaturasen und anderen Enzymen sowie zur weiteren Verbesserung des T7-Expressionssystems in *R. capsulatus* aufzeigen.

## VI Summary

Fatty acids and phospholipids are used for a multitude of applications. As chemical synthesis of those compounds is not efficiently possible, they are usually produced via biotechnological processes. Especially in green biotechnology, fatty acid-modifying enzymes are widely used for the functionalization of fatty acids. However, genetic modification of these organisms is time-consuming and complicated. Alternatively, microorganisms can be used as producers of fatty acids and phospholipids. Within this thesis, the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* has been used for heterologous expression of fatty acid desaturases as well as for production of foreign phospholipids. To this end, first the expression properties of the new T7 expression strain *R. capsulatus* B10S-T7 were characterized by heterologous expression of the reporter protein YFP. It was shown that addition of increasing concentrations of inducer could modulate the yield of the heterologous protein. The maximum yield with this strain was 30mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> under aerobic and 80mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> under phototrophic growth conditions. Additionally, the yield of YFP in *R. capsulatus* B10S could be increased by deletion of endogenous genes encoding the proteases Lon, ClpP and HslV. To incorporate foreign fatty acids into the membrane of *R. capsulatus* as substrates for fatty acid modifying enzymes, the cells were grown in the presence of various fatty acid supplements in the culture medium. Oleic acid, linoleic acid, *cis*-vaccenic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, but not conjugated linoleic acid, could be integrated into the host membrane. The assimilation efficiency for oleic and linoleic acid could be further increased by specific inhibition of the endogenous biosynthesis of unsaturated fatty acids. This optimization allowed for the foreign fatty acid to be integrated into the membrane to yield up to 37% of total fatty acids. Finally, heterologous expression of fatty acid desaturases showed that these enzymes accumulated in *E. coli* BL21(DE3). Limiting expression time to four hours proved to be essential to obtain high yields. Activity analysis showed that only the desaturases from *Bacillus subtilis* and *Stappia aggregata* were functionally expressed. In *R. capsulatus* only small amounts of the heterologous proteins were synthesized and no activity was detectable. However, the experiments revealed possible limitations for future studies about heterologous expression of fatty acid desaturases and other enzymes as well as for further improvement of the T7 expression system in *R. capsulatus*.

## VII Literaturverzeichnis

**Adamska E, Cegielska-Taras T, Kaczmarek Z, Szala L:** Multivariate approach to evaluating the fatty acid composition of seed oil in a doubled haploid population of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Appl Genet.* 2004; 45(4):419

**Ades SE:** Proteolysis: Adaptor, adaptor, catch me a catch. *Curr Biol.* 2004; 14(21):R924

**Aguilar PS, de Mendoza D:** Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol.* 2006; 62(6):1507

**Altabe SG, Aguilar P, Caballero GM, de Mendoza D:** The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J Bacteriol.* 2003; 185(10):3228

**Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, März L:** Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J.* 1999; 16(2):109

**Alvarez HM, Steinbüchel A:** Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002; 60(4):367

**Andersson L, Yang S, Neubauer P, Enfors S-O:** Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 1996; 46: 255

**Andrews BT, Gosavi S, Finke JM, Onuchic JN, Jennings PA:** The dual-basin landscape in GFP folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(34):12283

**Angov E, Hillier CJ, Kincaid RL, Lyon JA:** Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2189

**Antonopoulou S, Oikonomou A, Karantonis HC, Fragopoulou E, Pantazidou A:** Isolation and structural elucidation of biologically active phospholipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria). *Biochem J.* 2002; 367(Pt 1):287

**Apiradee H, Kalyanee P, Pongsathon P, Patcharaporn D, Matura S, Sanjukta S, Supapon C, Morakot T:** The expression of three desaturase genes of *Spirulina platensis* in *Escherichia coli* DH5alpha. Heterologous expression of *Spirulina*-desaturase genes. *Mol Biol Rep.* 2004; 31(3):177

**Aronel V, Benning C, Somerville CR:** Isolation and functional expression in *Escherichia coli* of a gene encoding phosphatidylethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem.* 1993; 268(21):16002

**Azizan A, Sherin D, DiRusso CC, Black PN:** Energetics underlying the process of long-chain fatty acid transport. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 365(2):299

**Banecki B, Wawrzynow A, Puzewicz J, Georgopoulos C, Zylicz M:** Structure-function analysis of the zinc-binding region of the ClpX molecular chaperone. *J Biol Chem.* 2001;276(22):18843

**Baneyx F, Mujacic M:** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(11): 1399

**Bao X, Thelen JJ, Bonaventure G, Ohlrogge JB:** Characterization of cyclopropane fatty-acid synthase from *Sterculia foetida*. *J Biol Chem.* 2003; 278(15):12846

**Barnard GC, Henderson GE, Srinivasan S, Gerngross TU:** High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. *Protein Expr Purif.* 2004; 38: 264

**Barra A:** Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Nat Prod Commun.* 2009; 4(8):1147

**Bauer C, Elsen S, Swem LR, Swem DL, Masuda S:** Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Phil Trans R Soc Lond B.* 2003; 258: 147

**Behrouzian B, Buist PH:** Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 68(2):107

**Bergé JP, Barnathan G:** Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005; 96:49

**Beselin A:** Optimization of lipase production in *Burkholderia glumae*. *Dissertation, Ruhr-Universität Bochum,* 2005

**Birch EE, Carlson SE, Hoffman DR, Fitzgerald-Gustafson KM, Fu VL, Drover JR, Castañeda YS, Minns L, Wheaton DK, Mundy D, Marunycz J, Diersen-Schade DA:** The DIAMOND (DHA Intake And Measurement Of Neural Development) Study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(4):848

**Black PN, Zhang Q, Weimar JD, DiRusso CC:** Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem.* 1997; 272(8):4896

**Black PN, DiRusso CC:** Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(3):454

**Boehm R:** Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1102:121

**Bonamore A, Macone A, Colotti G, Matarese RM, Boffi A:** The desaturase from *Bacillus subtilis*, a promising tool for the selective olefination of phospholipids. *J Biotechnol.* 2006; 121: 49

**Bortolotti A, Pérez-Dorado I, Goñi G, Medina M, Hermoso JA, Carrillo N, Cortez N:** Coenzyme binding and hydride transfer in *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin/ flavodoxin NADP(H) oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794(2):199

**Bouwman AF, Van Grinsven JJ, Eickhout B:** Consequences of the cultivation of energy crops for the global nitrogen cycle. *Ecol Appl.* 2010; 20(1):101

**Bretz J, Losada L, Lisboa K, Hutcheson SW:** Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol.* 2002; 45(2):397

**Broadwater JA, Whittle E, Shanklin J:** Desaturation and hydroxylation. Residues 148 and 324 of *Arabidopsis* FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity. *J Biol Chem.* 2002; 277(18):15613

**Brunaldi K, Simard JR, Kamp F, Rewal C, Asawakarn T, O'Shea P, Hamilton JA:** Fluorescence assays for measuring fatty acid binding and transport through membranes. *Methods Mol Biol.* 2007; 400:237

**Bruno MJ, Koeppe RE 2nd, Andersen OS:** Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(23):9638

**Brunschwig E, Darzins A:** A two-component T7-system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1992; 111: 35

**Buist PH:** Exotic biomodification of fatty acids. *Nat Prod Rep.* 2007; 24(5):1110

**Burton RE, Baker TA, Sauer RT:** Nucleotide-dependent substrate recognition by the AAA+ HslUV protease. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12(3):245

**Buttke TM, Ingram LO:** Inhibition of unsaturated fatty acid synthesis in *Escherichia coli* by the antibiotic cerulenin. *Biochemistry.* 1978; 17(24):5282

**Byers DM, Gong H:** Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem Cell Biol.* 2007; 85(6):649

**Cahoon EB, Ripp KG, Hall SE, Kinney AJ:** Formation of conjugated delta8,delta10-double bonds by delta12-oleic-acid desaturase-related enzymes: biosynthetic origin of calendic acid. *J Biol Chem.* 2001; 276(4):2637

**Cahoon EB, Ripp KG, Hall SE, McGonigle B:** Transgenic production of epoxy fatty acids by expression of a cytochrome P450 enzyme from *Euphorbia lagascae* seed. *Plant Physiol.* 2002; 128(2):615

**Cahoon EB, Kinney AJ:** Dimorphecolic acid is synthesized by the coordinate activities of two divergent Delta12-oleic acid desaturases. *J Biol Chem.* 2004; 279(13):12495-502.

**Cahoon EB, Shockey JM, Dietrich CR, Gidda SK, Mullen RT, Dyer JM:** Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. *Curr Opin Plant Biol.* 2007; 10(3):236

**Calder PC, Yaqoob P:** Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.* 2009; 121(6):148

**Calderone TL, Stevens RD, Oas TG:** High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1996; 262: 407-412

**Campanella A, Rustoy E, Baldessari A, Baltanás MA:** Lubricants from chemically modified vegetable oils. *Bioresour Technol.* 2010; 101(1):245

- Campbell TB, Lueking DR:** Long-chain fatty acid assimilation by *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J Bacteriol.* 1983; 153(2):782
- Campbell JW, Cronan JE Jr:** Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:305
- Carbone A, Zinovyev A, Képès F:** Codon adaption index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics* 2003; 19(16): 2005
- Carlsson AS, Thomaes S, Hamberg M, Stymne S:** Properties of two multifunctional plant fatty acid acetylenase/desaturase enzymes. *Eur J Biochem.* 2004; 271(14):2991
- Carlsson AS:** Plant oils as feedstock alternatives to petroleum - A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie.* 2009; 91(6):665
- Carty SM, Colbeau A, Vignais PM, Larson TJ:** Identification of the *rpmF-plsX-fabH* genes of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1994; 118(3):227-31.
- Chan CE, Lim AP, Chan AH, MacAry PA, Hanson BJ:** Optimized expression of full-length IgG1 antibody in a common *E. coli* strain. *PLoS One.* 2010; 5(4):e10261
- Chandu D, Nandi D:** Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Res Microbiol.* 2004; 155(9):710
- Chang S-W, Lee G-C, Shaw J-F:** Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 815
- Chang Y, Wesenberg GE, Bingman CA, Fox BG:** *In vivo* inactivation of the mycobacterial integral membrane stearyl coenzyme A desaturase DesA3 by a C-terminus-specific degradation process. *J Bacteriol.* 2008; 190(20):6686
- Chen C, Snedecor B, Nishihara JC, Joly JC, McFarland N, Anderson DC, Battersby JE, Champion KM:** High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (*degP prc spr*) host strain. *Biotechnol Bioeng.* 2004; 85(5): 463
- Chen D, Langford MP, Duggan C, Madden BJ, Edwards AO:** Expression of recombinant protein encoded by LOC387715 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2007; 54(2):275
- Chevallet M, Dupuis A, Issartel J-P, Lunardi J, van Belzen R, Albracht SPJ:** Two EPR-detectable [4Fe-4S]-clusters, N2a and N2b, are bound to the NuoI (TYKY) subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1557: 51
- Chevrier-Miller M, Jacques N, Raibaud O, Dreyfus M:** Transcription of single-copy hybrid *lacZ* genes by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli*: mRNA synthesis and degradation can be uncoupled from translation. *Nucl Acids Res.* 1990; 18(19): 5787
- Chi X, Yang Q, Zhao F, Qin S, Yang Y, Shen J, Lin H:** Comparative analysis of fatty acid desaturases in cyanobacterial genomes. *Comp Funct Genomics.* 2008; Art-ID 284508

**Chintalapati S, Prakash JS, Gupta P, Ohtani S, Suzuki I, Sakamoto T, Murata N, Shivaji S:** A novel Delta9 acyl-lipid desaturase, DesC2, from cyanobacteria acts on fatty acids esterified to the sn-2 position of glycerolipids. *Biochem J.* 2006; 398(2):207

**Christopherson RI, Cinquin O, Shojaei M, Kuehn D, Menz RI:** Cloning and expression of malarial pyrimidine enzymes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004; 23(8-9):1459

**Conde-Alvarez R, Grilló MJ, Salcedo SP, de Miguel MJ, Fugier E, Gorvel JP, Moriyón I, Iriarte M:** Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell Microbiol.* 2006; 8(8):1322

**Conrad B, Savchenko RS, Breves R, Hofemeister J:** A T7 promoter-specific, inducible protein expression system for *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* 1996; 250(2):230

**Copley KS, Alm SM, Schooley DA, Courchesne WE:** Expression, processing and secretion of a proteolytically-sensitive insect diuretic hormone by *Saccharomyces cerevisiae* requires the use of a yeast strain lacking genes encoding the Yap3 and Mkc7 endoproteases found in the secretory pathway. *Biochem J.* 1998; 330 (Pt 3):1333

**Corchero JL, Viaplana E, Benito A, Villaverde A:** The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *J Biotechnol.* 1996; 48(3): 191

**Corchero JL, Villaverde A:** Plasmid maintenance in *Escherichia coli* is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol Bioeng.* 1998; 58: 625

**Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T:** Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol.* 2009; 463:169

**Cronan JE Jr, Subrahmanyam S:** FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol Microbiol.* 1998; 29(4):937

**Cybulski LE, Albanesi D, Mansilla MC, Altabe S, Aguilar PS, de Mendoza D:** Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol Microbiol.* 2002; 45(5):1379

**Daly R, Hearn MT:** Expression of the human activin type I and II receptor extracellular domains in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2006; 46(2):456

**Damude HG, Zhang H, Farrall L, Ripp KG, Tomb JF, Hollerbach D, Yadav NS:** Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(25):9446

**Damude HG, Kinney AJ:** Enhancing plant seed oils for human nutrition. *Plant Physiol.* 2008; 147(3):962

**Daniels GA, Drews G, Saier MH Jr.:** Properties of a Tn5 insertion mutant defective in the structural gene (*fruA*) of the fructose-specific phosphotransferase system of *Rhodobacter capsulatus* and cloning of the *fru* Regulon. *J Bacteriol.* 1988; 170(4): 1698

- Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW:** Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2035
- Delgado-Olivares L, Zamora-Romo E, Guarneros G, Hernandez-Sanchez J:** Codon-specific and general inhibition of protein synthesis by the tRNA-sequestering minigenes. *Biochimie*. 2006; 88(7):793
- De Smet L, Pettigrew GW, van Beeumen JJ:** Cloning, overproduction and characterization of cytochrome c peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 6559
- Diaz AR, Mansilla MC, Vila AJ, de Mendoza D:** Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*. 2002; 277(50):48099
- DiRusso CC, Black PN:** Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *J Biol Chem*. 2004; 279(48):49563
- Domergue F, Abbadì A, Zähringer U, Moreau H, Heinz E:** *In vivo* characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochem J*. 2005; 389(Pt 2):483
- Dong H, Nilsson L, Kurland CG:** Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol*. 1995; 177(6): 1497
- Drepper T, Groß S, Yakunin AF, Hallenbeck PC, Masepohl B, Klipp W:** Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* 2003; 149: 2203
- Drepper T, Arvani S, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger KE:** High-level transcription of large gene regions: a novel T7 RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33(1)
- Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krauss U, Guterl JK, Wendorff M, Losi A, Gärtner W, Jaeger KE:** Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol*. 2007; 25: 443
- Drepper T, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Heck A, Jaeger KE, Katzke N, Markert A, Svensson V:** Verfahren und Vektor zur heterologen Genexpression. *Patent Application* DE 10 2008 2013 2304.2003, 2008
- Dresen C, Lin LY, D'Angelo I, Tocheva EI, Strynadka N, Eltis LD:** A flavin-dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism. *J Biol Chem*. 2010 (M109.099028).
- Drews G:** Formation of the light-harvesting complex I (B870) of anoxygenic phototrophic purple bacteria. *Arch Microbiol*. 1996; 166(3):151
- Drexler H, Spiekermann P, Meyer A, Domergue F, Zank T, Sperling P, Abbadì A, Heinz E:** Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results. *J Plant Physiol*. 2003; 160(7):779
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L:** The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif*. 2004; 37(1):203

- Duport C, Meyer C, Naud I, Jouanneau Y:** A new gene expression system based on a fructose-dependent promoter from *Rhodobacter capsulatus*. *Gene*. 1994; 145(1):103
- Durniak KJ, Bailey S, Steitz TA:** The structure of a transcribing T7 RNA polymerase in transition from initiation to elongation. *Science*. 2008; 322(5901):553-7.
- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J:** Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J*. 2008; 54(4):593
- Dyer JM, Chapital DC, Kuan JC, Mullen RT, Turner C, McKeon TA, Pepperman AB:** Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity. *Plant Physiol*. 2002; 130(4):2027
- Dyer JM, Mullen RT:** Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. *Physiol Plant*. 2008; 132(1):11
- Dyer JM, Stymne S, Green AG, Carlsson AS:** High-value oils from plants. *Plant J*. 2008; 54(4):640
- Edwards P, Nelsen JS, Metz JG, Dehesh K:** Cloning of the *fabF* gene in an expression vector and *in vivo* characterization of recombinant *fabF* and *fabB* encoded enzymes from *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 1997, 402: 62
- Elsen S, Swen LR, Swem DL, Bauer CE:** RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(2): 263
- Epand RF, Schmitt MA, Gellman SH, Sen A, Auger M, Hughes DW, Epand RM:** Bacterial species selective toxicity of two isomeric alpha/beta-peptides: role of membrane lipids. *Mol Membr Biol*. 2005; 22(6):457
- Erhan SZ, Sharma BK, Liu Z, Adhvaryu A:** Lubricant base stock potential of chemically modified vegetable oils. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(19):8919
- Fahnert B, Lilie H, Neubauer P:** Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2004; 89:93
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH Jr., Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA:** A comprehensive classification system for lipids. *J Lip Res*, 2005; 46: 839
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR:** Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol*. 2004; 4:17
- Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S, Hawthorne P:** Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science*. 2008; 319(5867):1235
- Feng Y, Cronan JE:** *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the *fabA* gene and *in vivo* identification of the essential reaction catalyzed by FabB. *J Biol Chem*. 2009; 284(43):29526
- Fetterman JW Jr, Zdanowicz MM:** Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm*. 2009; 66(13):1169

- Fischer J, Schauer F, Heipieper HJ:** The *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids is not applicable as biomarker for environmental stress in case of long-term contaminated habitats. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 (DOI 10.1007/s00253-010-2544-0)
- Forman MD, Stack RF, Masters PS, Hauer CR, Baxter SM:** High level, context dependent misincorporation of lysine for arginine in *Saccharomyces cerevisiae* a1 homeodomain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 1998; 7: 500
- Freigassner M, Pichler H, Glieder A:** Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microb Cell Fact.* 2009; 8:69
- Fu GK, Smith MJ, Markovitz DM:** Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem.* 1997; 272(1):534
- Fu GK, Markovitz DM:** The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry.* 1998; 37(7):1905
- Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K:** Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol.* 2007; 66(4):829
- Gagné SJ, Reed DW, Gray GR, Covello PS:** Structural control of chemoselectivity, stereoselectivity, and substrate specificity in membrane-bound fatty acid acetylenases and desaturases. *Biochemistry.* 2009; 48(51):12298
- Gao J, Ajjawi I, Manoli A, Sawin A, Xu C, Froehlich JE, Last RL, Benning C:** FATTY ACID DESATURASE4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant J.* 2009; 60(5):832
- Georgiou G, Valax P:** Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 1996; 7: 190
- Gawarzewski I:** Temperatur- und lichtabhängige Anpassung der bakteriellen Zellmembranen in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, 2009
- Gilchrist MA, Shah P, Zaretski R:** Measuring and detecting molecular adaptation in codon usage against nonsense errors during protein translation. *Genetics.* 2009; 183(4):1493
- Gill RT, Valdes JJ, Bentley WE:** A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2000; 2: 178
- Glick BR:** Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv.* 1995; 13(2): 247
- Glisic S, Lukic I, Skala D:** Biodiesel synthesis at high pressure and temperature: analysis of energy consumption on industrial scale. *Bioresour Technol.* 2009; 100(24):6347
- Gonzalez de Valdivia EI, Isaksson LA:** Abortive translation caused by peptidyl-tRNA drop-off at NGG codons in the early coding region of mRNA. *FEBS J.* 2005; 272(20):5306

- Gostincar C, Turk M, Gunde-Cimerman N:** The evolution of fatty acid desaturases and cytochrome b5 in eukaryotes. *J Membr Biol.* 2010; 233(1-3):63
- Graef G, LaVallee BJ, Tenopir P, Tat M, Schweiger B, Kinney AJ, Van Gerpen JH, Clemente TE:** A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnol J.* 2009; 7(5):411
- Gregor J, Klug G:** Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 179: 1
- Groves JD, Falson P, le Maire M, Tanner MJ:** Functional cell surface expression of the anion transport domain of human red cell band 3 (AE1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(22):12245
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J:** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 2004; 22(4): 346
- Gutierrez-Ríos RM, Freyre-Gonzalez JA, Resendis O, Collado-Vides J, Saier M, Gosset G:** Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 2007; 7:53
- Gutman GA, Hatfield GW:** Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 3699
- Hamilton JA:** Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res.* 1998; 39(3):467
- Hamilton JA:** New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007; 77(5-6):355
- Hanahan D:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; 166: 557
- Hara Y, Seki M, Matsuoka S, Hara H, Yamashita A, Matsumoto K:** Involvement of PlsX and the acyl-phosphate dependent sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsY in the initial stage of glycerolipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet Syst.* 2008; 83(6):433
- Harcum SW, Bentley WE:** Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 1999; 80(1): 23
- Harmer T, Wu M, Schleif R:** The role of rigidity in DNA looping-unlooping by AraC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(2): 427
- Harnack K, Andersen G, Somoza V:** Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutr Metab (Lond).* 2009; 6:8
- Harwood JL, Guschina IA:** The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie.* 2009; 91(6):679
- Hearn EM, Patel DR, Lepore BW, Indic M, van den Berg B:** Transmembrane passage of hydrophobic compounds through a protein channel wall. *Nature.* 2009; 458(7236):367

- Heck A:** Etablierung eines Fluoreszenzprotein-basierten *in vivo* Reportergensystems in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. *Diplomarbeit, Universität Düsseldorf*, 2005
- Henry I, Sharp PM:** Predicting gene expression level from codon usage bias. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(1):10
- Henry RJ:** Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil. *Plant Biotechnol J.* 2010; 8(3):288
- Heppard EP, Kinney AJ, Stecca KL, Miao GH:** Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* 1996; 110(1):311
- Hernández ML, Mancha M, Martínez-Rivas JM:** Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochemistry.* 2005; 66(12):1417
- Herrero M, de Lorenzo V, Ensley B, Timmis KN:** A T7 RNA polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-meta pathways effectors. *Gene* 1993; 134: 103
- Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D:** Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(30):11206
- Hoffmann F, Rinas U:** Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2004; 89:73
- Hoffmann M, Wagner M, Abadi A, Fulda M, Feussner I:** Metabolic engineering of omega3-very long chain polyunsaturated fatty acid production by an exclusively acyl-CoA-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2008; 283(33):22352
- Hölzl G, Dörmann P:** Structure and function of glycoacyl lipids in plants and bacteria. *Prog Lipid Res.* 2007; 46(5):225
- Hornung E, Pernstich C, Feussner I:** Formation of conjugated Delta11Delta13-double bonds by Delta12-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *Eur J Biochem.* 2002; 269(19):4852
- Hou CT:** Biotechnology for fats and oils: new oxygenated fatty acids. *N Biotechnol.* 2009; 26(1-2):2
- Hu G, Lu Y, Wei D:** Fatty acid composition of the seed oil of *Allium tuberosum*. *Bioresour Technol.* 2005; 96(14):1630
- Huang JZ, Jiang XZ, Xia XF, Yu AQ, Mao RY, Chen XF, Tian BY:** Cloning and Functional Identification of Delta5 Fatty Acid Desaturase Gene and Its 5'-Upstream Region from Marine Fungus *Thraustochytrium* sp. FJN-10. *Mar Biotechnol (NY).* 2010. (DOI 10.1007/s10126-010-9262-6)
- Idiris A, Tohda H, Bi KW, Isoai A, Kumagai H, Giga-Hama Y:** Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 73(2):404
- Iram SH, Cronan JE:** Unexpected functional diversity among FadR fatty acid transcriptional regulatory proteins. *J Biol Chem.* 2005; 280(37):32148

- Iwig DF, Grippe AT, McIntyre TA, Booker SJ:** Isotope and elemental effects indicate a rate-limiting methyl transfer as the initial step in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase. *Biochemistry*. 2004; 43(42):13510
- Jackson MW, Silva-Herzog E, Plano GV:** The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol Microbiol*. 2004; 54(5):1364
- Jana S, Deb JK:** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 67: 289
- Jaworski J, Cahoon EB:** Industrial oils from transgenic plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2003; 6(2):178
- Jensen CL, Stephenson K, Jørgensen ST, Harwood C:** Cell-associated degradation affects the yield of secreted engineered and heterologous proteins in the *Bacillus subtilis* expression system. *Microbiology*. 2000; 146 (Pt 10):2583
- Jeong H-S, Jouanneau Y:** Enhanced nitrogenase activity in strains of *Rhodobacter capsulatus* that overexpress the *rnf* genes. *J Bacteriol*. 2000; 182(5): 1208
- Jiang X, Oohira K, Iwasaki Y, Nakano H, Ichihara S, Yamane T:** Reduction of protein degradation by use of protease-deficient mutants in cell-free protein synthesis system of *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*. 2002; 93(2):151
- Jiang YM, Tong WY, Wei DZ:** Effects of induction starting time and  $\text{Ca}^{2+}$  on expression of active penicillin G acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 2007; 23(5):1031
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren P-A, Stahl S:** Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl. Biochem*. 2002; 35: 91
- Joshi HM, Tabita FR:** A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 14515
- Kainou K, Kamisaka Y, Kimura K, Uemura H:** Isolation of Delta12 and omega3-fatty acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and alpha-linolenic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006; 23(8):605
- Kalscheuer R, Stöveken T, Luftmann H, Malkus U, Reichelt R, Steinbüchel A:** Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(2):1373
- Kamp F, Hamilton JA:** How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006; 75(3):149
- Kandilogiannaki M, Koutsoudakis G, Zafiroopoulos A, Krambovitis E:** Expression of a recombinant human anti-MUC1 scFv fragment in protease-deficient *Escherichia coli* mutants. *Int J Mol Med*. 2001; 7(6):659

**Kane JF, Violand BN, Curran DF, Staten NR, Duffin KL, Bogosian G:** Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res.* 1992; 20(24): 6707

**Katzke N:** Entwicklung eines neuen Systems zur heterologen Expression von Redoxsystemen in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. *Diplomarbeit, Universität Düsseldorf*, 2006

**Katzke N, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Markert A, Svensson V, Jaeger KE, Heck A, Drepper T:** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif.* 2010; 69(2):137

**Kim YI, Burton RE, Burton BM, Sauer RT, Baker TA:** Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol Cell.* 2000; 5(4):639

**Kim S, Lee SB:** Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2006; 50(1):49

**Kim EJ, Kim MS, Lee JK:** Phosphatidylcholine is required for the efficient formation of photosynthetic membrane and B800-850 light-harvesting complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Microbiol Biotechnol.* 2007; 17(2):373

**Kinney AJ:** Designer oils for better nutrition. *Nat Biotechnol.* 1996; 14(8):946

**Klipp W, Masepohl B, Pühler A:** Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *J Bacteriol.* 1988; 170: 693

**Klug RM, Benning C:** Two enzymes of diacylglyceryl-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine biosynthesis are encoded by *btaA* and *btaB* in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(10):5910

**Kochhar SP, Henry CJ:** Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils. *Int J Food Sci Nutr.* 2009; 60 Suppl 7:289

**Kochetkov SN, Rusakova EE, Tunitskaya VL:** Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Lett.* 1998; 440: 264

**Koide K, Ito K, Akiyama Y:** Substrate recognition and binding by RseP, an *Escherichia coli* intramembrane protease. *J Biol Chem.* 2008; 283(15):9562

**Kolaj O, Spada S, Robin S, Wall JG:** Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2009; 8:9

**Kreuz A:** Untersuchungen zur Funktion von Proteasen bei der Regulation der beiden Nitrogenase-Systeme in dem phototrophen Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*. *Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum*, 2003.

**Krishna Rao DV, Rao JV, Narasu ML, Bhujanga Rao AK:** Optimization of the AT-content of codons immediately downstream of the initiation codon and evaluation of culture conditions for high-level expression of recombinant human G-CSF in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.* 2008; 38(3):221

**Kucz N:** Erzeugung eines nif-Promotor basierten Expressionssystems in *Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 2005

**Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al.:** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1997; 390(6657):249

**Kurdrid P, Subudhi S, Cheevadhanarak S, Tanticharoen M, Hongsthong A:** Effect of two intermediate electron donors, NADPH and FADH(2), on *Spirulina* Delta (6)-desaturase co-expressed with two different immediate electron donors, cytochrome b (5) and ferredoxin, in *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep*. 2007; 34(4):261

**Kuroda A:** A polyphosphate-lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70(2):325

**Kwon AR, Trame CB, McKay DB:** Kinetics of protein substrate degradation by HslUV. *J Struct Biol*. 2004; 146(1-2):141-7

**Laible PD, Scott HN, Henry L, Hanson DK:** Towards higher-throughput membrane protein production for structural genomics initiatives. *J Struct Funct Genomics*. 2004; 00:1

**Lam MK, Lee KT, Mohamed AR:** Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnol Adv*. 2010 (DOI 10.1016/j.biotechadv.2010.03.002)

**Lang SE, Jenney FE, Daldal F:** *Rhodobacter capsulatus* CycH: a bipartite gene product with pleiotropic effects on the biogenesis of structurally different c-Type Cytochromes. *J Bacteriol*. 1996; 178(17): 5279

**Langer M, Gabor EM, Liebeton K, Meurer G, Niehaus F, Schulze R, Eck J, Lorenz P:** Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol J*. 2006; 1(7-8):815

**Laskowska E, Kuczyńska-Wiśnik D, Skórko-Glonek J, Taylor A:** Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vivo*. *Mol Microbiol*. 1996; 22(3):555

**LaVallie ER, McCoy JM:** Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1995; 6: 501

**León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E:** Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol*. 2004; 22(1):45

**Leonard E, Yan Y, Fowler ZL, Li Z, Lim CG, Lim KH, Koffas MA:** Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Mol Pharm*. 2008; 5(2):257

**Lesley SA, Graziano J, Cho CY, Knuth MW, Klock HE:** Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Eng*. 2002; 5(2): 153

**Lestari S, Mäki-Arvela P, Beltramini J, Lu GQ, Murzin DY:** Transforming triglycerides and fatty acids into biofuels. *Chem Sus Chem*. 2009; 2(12):1109

**LeThanh H, Neubauer P, Hoffmann F:** The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microb Cell Fact.* 2005; 4:6

**Levitan EB, Wolk A, Mittleman MA:** Fatty fish, marine omega-3 fatty acids and incidence of heart failure. *Eur J Clin Nutr.* 2010 (doi:10.1038/ejcn.2010.50)

**Lewis RNAH, McElhaney RN:** The mesomorphic phase behaviour of lipid bilayers. In: P. L. Yeagle (Ed.) - The Structure of Biological Membranes, Second Edition (CRC Press), 2005

**Li W, Zhou X, Lu P:** Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol.* 2004; 155(8):605

**Li D, Hu X:** Fish and its multiple human health effects in times of threat to sustainability and affordability: are there alternatives? *Asia Pac J Clin Nutr.* 2009; 18(4):553

**Li Z, Tran VH, Duke RK, Ng MC, Yang D, Duke CC:** Synthesis and biological activity of hydroxylated derivatives of linoleic acid and conjugated linoleic acids. *Chem Phys Lipids.* 2009; 158(1):39

**Li R, Yu K, Hatanaka T, Hildebrand DF:** Vernonia DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnol J.* 2010; 8(2):184

**Lien HY, Shy RS, Peng SS, Wu YL, Weng YT, Chen HH, Su PC, Ng WF, Chen YC, Chang PY, Wu WF:** Characterization of the *Escherichia coli* ClpY (HslU) substrate recognition site in the ClpYQ (HslUV) protease using the yeast two-hybrid system. *J Bacteriol.* 2009; 191(13):4218

**Lin YC, Lee WJ, Chao HR, Wang SL, Tsou TC, Chang-Chien GP, Tsai PJ:** Approach for energy saving and pollution reducing by fueling diesel engines with emulsified biosolution/ biodiesel/diesel blends. *Environ Sci Technol.* 2008; 42(10):3849

**Loppnow H, Libby P, Freudenberg M, Krauss JH, Weckesser J, Mayer H:** Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infect Immun.* 1990; 58(11):3743

**Los DA, Murata N:** Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1394(1):3

**Lu Y, Larock RC:** Novel polymeric materials from vegetable oils and vinyl monomers: preparation, properties, and applications. *ChemSusChem.* 2009; 2(2):136

**Lundbaek JA, Collingwood SA, Ingólfsson HI, Kapoor R, Andersen OS:** Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *J R Soc Interface.* 2010; 7(44):373

**Lussier FX, Denis F, Shareck F:** Adaptation of the highly productive T7 expression system to *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(3):967

**Maehara T, Hoshino T, Nakamura A:** Characterization of three putative Lon proteases of *Thermus thermophilus* HB27 and use of their defective mutants as hosts for production of heterologous proteins. *Extremophiles.* 2008; 12(2):285

- Maggio M, Artoni A, Lauretani F, Borghi L, Nouvenne A, Valenti G, Ceda GP:** The impact of omega-3 fatty acids on osteoporosis. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(36):4157
- Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, Cronan JE Jr:** Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1993; 57(3):522
- Makrides SC:** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1996; 60(3):512
- Mansell TJ, Fisher AC, DeLisa MP:** Engineering the protein folding landscape in gram-negative bacteria. *Curr Protein Pept Sci.* 2008; 9(2):138
- Mansilla MC, de Mendoza D:** The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch Microbiol.* 2005; 183: 229
- Mansilla MC, Banchio CE, de Mendoza D:** Signalling pathways controlling fatty acid desaturation. *Subcell Biochem.* 2008; 49:71
- Martinez A, Knappskog PM, Olafsdottir S, Døskeland AP, Eiken HG, Svebak RM, Bozzini ML, Apold J, Flatmark T:** Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. *Biochem J.* 1995; 306: 589
- Martínez-Martínez I, Navarro-Fernandez J, Lozada-Ramírez JD, García-Carmona F, Sanchez-Ferrer A:** Maximization of production of his-tagged glycine oxidase and its M261 mutant proteins. *Biotechnol Prog.* 2006; 22(3):647
- Martínez-Morales F, Schobert M, López-Lara IM, Geiger O:** Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology,* 2003; 149: 3461
- Masepohl B, Drepper T, Paschen A, Groß S, Pawlowski A, Raabe K, Riedel KU, Klipp W:** Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2002; 4(3): 243
- Maurizi MR:** Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia.* 1992; 48(2):178
- Maya D, Quintero MJ, de la Cruz Muñoz-Centeno M, Chávez S:** Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 2008; 30(6):979
- McCrindle SL, Kappler U, McEwan AG:** Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. *Adv Microb Physiol.* 2005; 50:147
- McKinney J, Guerrir-Takada C, Galán J, Altman S:** Tightly regulated gene expression system in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2002; 184(21): 6056
- McNulty DE, Claffee BA, Huddleston MJ, Kane JF:** Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2003; 27: 365
- Meesapyodsuk D, Reed DW, Covello PS, Qiu X:** Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*. *J Biol Chem.* 2007; 282(28):20191

- Meesapyodsuk D, Qiu X:** An oleate hydroxylase from the fungus *Claviceps purpurea*: cloning, functional analysis, and expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2008; 147(3):1325
- Melillo JM, Reilly JM, Kicklighter DW, Gurgel AC, Cronin TW, Paltsev S, Felzer BS, Wang X, Sokolov AP, Schlosser CA:** Indirect emissions from biofuels: how important? *Science.* 2009; 326(5958):1397
- Metzger JO, Bornscheuer U:** Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 71(1):13
- Millar AA, Smith MA, Kunst L:** All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci.* 2000; 5(3):95
- Miroux B, Walker JE:** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 1996; 260(3):289
- Morgan-Kiss RM, Cronan JE:** The *Lactococcus lactis* FabF fatty acid synthetic enzyme can functionally replace both the FabB and FabF proteins of *Escherichia coli* and the FabH protein of *Lactococcus lactis*. *Arch Microbiol.* 2008; 190(4):427
- Morita N, Ichise N, Yumoto I, Yutaka Y, Ohgiya S, Okuyama H:** Cultivation of microorganisms in the cultural medium made from squid internal organs and accumulation of polyunsaturated fatty acids in the cells. *Biotech Lett.* 2005; 27:933
- Murby M, Samuelsson E, Nguyen TN, Mignard L, Power U, Binz H, Uhlen M, Stahl S:** Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. *Eur J Biochem.* 1995; 230: 38
- Mushrush GW, Wynne JH, Willauer HD, Lloyd CL:** Soybean-derived biofuels and home heating fuels. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2006; 41(11):2495
- Nakamura MT, Nara TY:** Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24:345
- Napier JA, Graham IA:** Tailoring plant lipid composition: designer oilseeds come of age. *Curr Opin Plant Biol.* 2010 ( doi:10.1016/j.pbi.2010.01.008)
- Napier JA, Michaelson LV:** Genomic and functional characterization of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Lipids.* 2001; 36(8):761
- Napier JA, Michaelson LV, Sayanova O:** The role of cytochrome b5 fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 68(2):135
- Nie L, Ren Y, Janakiraman A, Smith S, Schulz H:** A novel paradigm of fatty acid beta-oxidation exemplified by the thioesterase-dependent partial degradation of conjugated linoleic acid that fully supports growth of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2008; 47(36):9618
- Nilsson T, Martínez E, Manresa A, Oliw EH:** Liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of 7,10-dihydroxyoctadecenoic acid, its isotopomers, and other 7,10-dihydroxy fatty acids formed by *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(6): 777

**Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T:** Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(5): 1694

**Nogués I, Pérez-Dorado I, Frago S, Bittel C, Mayhew SG, Gómez-Moreno C, Hermoso JA, Medina M, Cortez N, Carrillo N:** The ferredoxin-NADP(H) reductase from *Rhodobacter capsulatus*: molecular structure and catalytic mechanism. *Biochemistry.* 2005; 44(35):11730

**Nomata J, Ogawa T, Kitashima M, Inoue K, Fujita Y:** NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters. *FEBS Lett.* 2008; 582(9):1346

**Nordhoff S, Höcker H, Gebhardt H:** Renewable resources in the chemical industry--breaking away from oil? *Biotechnol J.* 2007; 2(12):1505

**Oh CS, Martin CE:** *Candida albicans* Spt23p controls the expression of the Ole1p Delta9 fatty acid desaturase and regulates unsaturated fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem.* 2006; 281(11):7030

**Ohlrogge J, Browse J:** Lipid biosynthesis. *Plant Cell.* 1995; 7(7):957

**Onder O, Turkarslan S, Sun D, Daldal F:** Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol: disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(5):875

**Opekarová M, Tanner W:** Specific lipid requirements of membrane proteins – a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1610: 11

**Ow DS, Lee RM, Nissom PM, Philp R, Oh SK, Yap MG:** Inactivating FruR global regulator in plasmid-bearing *Escherichia coli* alters metabolic gene expression and improves growth rate. *J Biotechnol.* 2007; 131(3):261

**Palaskar DV, Boyer A, Cloutet E, Alfos C, Cramail H:** Synthesis of Biobased Polyurethane from Oleic and Ricinoleic Acids as the Renewable Resources via the AB-Type Self-Condensation Approach. *Biomacromolecules.* 2010 (DOI: 10.1021/bm100233v)

**Panpoom S, Los DA, Murata N:** Biochemical characterization of a delta12 acyl-lipid desaturase after overexpression of the enzyme in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1390(3):323

**Passorn S, Laoteng K, Rachadawong S, Tanticharoen M, Cheevadhanarak S:** Heterologous expression of *Mucor rouxii* delta(12)-desaturase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 263(1):47

**Peng Q, Hu Y, Wei R, Zhang Y, Guan C, Ruan Y, Liu C:** Simultaneous silencing of FAD2 and FAE1 genes affects both oleic acid and erucic acid contents in *Brassica napus* seeds. *Plant Cell Rep.* 2010; 29(4):317

**Peti W, Page R:** Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr Purif.* 2007; 51(1):1

- Petrie JR, Liu Q, Mackenzie AM, Shrestha P, Mansour MP, Robert SS, Frampton DF, Blackburn SI, Nichols PD, Singh SP:** Isolation and Characterisation of a High-Efficiency Desaturase and Elongases from Microalgae for Transgenic LC-PUFA Production. *Mar Biotechnol (NY)*. 2009 (DOI 10.1007/s10126-009-9230-1)
- Petrie JR, Shrestha P, Mansour MP, Nichols PD, Liu Q, Singh SP:** Metabolic engineering of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in plants using an acyl-CoA Delta6-desaturase with omega3-preference from the marine microalga *Micromonas pusilla*. *Metab Eng*. 2010; 12(3):233
- Petrini GA, Altabe SG, Uttaro AD:** *Trypanosoma brucei* oleate desaturase may use a cytochrome b5-like domain in another desaturase as an electron donor. *Eur J Biochem*. 2004; 271(6):1079
- Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibáñez E:** Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(16):7159
- Racine RA, Deckelbaum RJ:** Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007; 10(2):123
- Racine NM, Watras AC, Carrel AL, Allen DB, McVean JJ, Clark RR, O'Brien AR, O'Shea M, Scott CE, Schoeller DA:** Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(5):1157
- Raman N, Black PN, DiRusso CC:** Characterization of the fatty acid-responsive transcription factor FadR. Biochemical and genetic analyses of the native conformation and functional domains. *J Biol Chem*. 1997; 272(49):30645
- Ramírez DM, Bentley WE:** Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures: *J Biotechnol*. 1999; 71: 39
- Reynolds CM, Roche HM:** Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signalling. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010; 82(4-6):199
- Rinas U, Bailey JE:** Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre- $\beta$ -lactamase into cytoplasmic inclusion bodies. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59(2): 561
- Rinas U, Hoffmann F, Betiku E, Estapé D, Marten S:** Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated *in vivo* inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2007; 127(2):244
- Rippka R:** Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol*. 1988; 167:3
- Rittmann BE:** Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol Bioeng*. 2008; 100(2):203
- Robert SS:** Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-containing oils in transgenic land plants for human and aquaculture nutrition. *Mar Biotechnol (NY)*. 2006; 8(2):103
- Rock CO, Cronan JE:** *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1302(1):1

**Rock CO, Jackowski S:** Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292(5):1155

**Romantsov T, Guan Z, Wood JM:** Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788(10):2092

**Rosenberg AH, Lade BN, Chui D-S, Lin S-W, Dunn JJ, Studier FW:** Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 1987; 56: 125

**Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ:** A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19(5):430

**Rossi FMV, Blau HM:** Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol.* 1998; 9: 451

**Röttig A, Wenning L, Bröker D, Steinbüchel A:** Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 85(6):1713

**Roy A, Shukla AK, Haase W, Michel H:** Employing *Rhodobacter sphaeroides* to functionally express and purify human G protein-coupled receptors. *Biol Chem.* 2008; 389(1):69

**Roymondal U, Das S, Sahoo S:** Predicting gene expression level from relative codon usage bias: an application to *Escherichia coli* genome. *DNA Res.* 2009; 16(1):13

**Ryu S, Ramseier TM, Michotey V, Saier MH Jr, Garges S:** Effect of the FruR regulator on transcription of the *pts* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1995; 270(6):2489

**Sabate R, de Groot NS, Ventura S:** Protein folding and aggregation in bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 2010 (DOI 10.1007/s00018-010-0344-4)

**Saïda F:** Overview on the expression of toxic gene products in *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* 2007; Chapter 5:Unit 5.19

**Sainz G, Jakoncic J, Sieker LC, Stojanoff V, Sanishvili N, Asso M, Bertrand P, Armengaud J, Jouanneau Y:** Structure of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus* likely involved in Fe-S cluster biogenesis and conformational changes observed upon reduction. *J Biol Inorg Chem.* 2006; 11(2):235

**Sakamoto T, Los DA, Higashi S, Wada H, Nishida I, Ohmori M, Murata N:** Cloning of omega 3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation. *Plant Mol Biol.* 1994; 26(1):249

**Sakoh M, Ito K, Akiyama Y:** Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2005; 280(39):33305

**Sakuradani E, Ando A, Ogawa J, Shimizu S:** Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 84(1):1

- Santiago-Machuca AE, Ruiz-Pérez F, Delgado-Dominguez JS, Becker I, Isibasi A, González-Bonilla CR:** Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhi live vector with inducible chromosomal expression of the T7 RNA polymerase and its evaluation with reporter genes. *Plasmid* 2002; 47: 108
- Sardesai Y, Bhosle S:** Tolerance of bacteria to organic solvents. *Res Microbiol.* 2002; 153(5):263
- Sayanova O, Haslam R, Guschina I, Lloyd D, Christie WW, Harwood JL, Napier JA:** A bifunctional Delta12,Delta15-desaturase from *Acanthamoeba castellanii* directs the synthesis of highly unusual n-1 series unsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2006; 281(48):36533
- Schaffer JE:** Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282(2):E239
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP:** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol.* 2004; 50(1):1
- Scherer C, Müller KD, Rath PM, Ansorg RA:** Influence of culture conditions on the fatty acid profiles of laboratory-adapted and freshly isolated strains of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(3):1114
- Schewe H, Kaup BA, Schrader J:** Improvement of P450(BM-3) whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 78(1):55
- Schmelter T, Trigatti BL, Gerber GE, Mangroo D:** Biochemical demonstration of the involvement of fatty acyl-CoA synthetase in fatty acid translocation across the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2004; 279(23): 24163
- Schmidt FR:** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 65(4):363
- Schujman GE, de Mendoza D:** Transcriptional control of membrane lipid synthesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2005, 8: 149
- Schumann S, Saggi M, Möller N, Anker SD, Lenzian F, Hildebrandt P, Leimkühler S:** The mechanism of assembly and cofactor insertion into *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2008; 283(24):16602
- Schweizer HP:** Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in Pseudomonads. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; 12(5):439
- Serra M, Gauthier LT, Fabrias G, Buist PH:** Delta11 desaturases of *Trichoplusia ni* and *Spodoptera littoralis* exhibit dual catalytic behaviour. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006; 36(10):822
- Shabala L, Ross T:** Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H<sup>+</sup> and enhanced ability to extrude H<sup>+</sup>. *Res Microbiol.* 2008; 159(6):458
- Shanklin J, Cahoon EB:** Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1998; 49:611

**Sharma N, Anderson M, Kumar A, Zhang Y, Giblin EM, Abrams SR, Zaharia LI, Taylor DC, Fobert PR:** Transgenic increases in seed oil content are associated with the differential expression of novel *Brassica*-specific transcripts. *BMC Genomics*. 2008; 9:619

**Shen QT, Bai XC, Chang LF, Wu Y, Wang HW, Sui SF:** Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(12):4858

**Shivaji S, Prakash JS:** How do bacteria sense and respond to low temperature? *Arch Microbiol*. 2010; 192(2):85

**Sijtsma L, de Swaaf ME:** Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 64(2):146

**Simon R, Priefer U, Pühler A:** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology (N. Y.)* 1983; 1: 784

**Simopoulos AP:** The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233(6):674

**Singh SP, Zhou XR, Liu Q, Stymne S, Green AG:** Metabolic engineering of new fatty acids in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2005; 8(2):197

**Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q:** Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci*. 2009; 18(5):936

**Skorić D, Jocić S, Sakac Z, Lecić N:** Genetic possibilities for altering sunflower oil quality to obtain novel oils. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008; 86(4):215

**Skosyrev VS, Kuleskiy EA, Yakhnin AV, Temirov YV, Vinokurov LM:** Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif*. 2003; 28(2): 350

**Smart JL, Willett JW, Bauer CE:** Regulation of hem gene expression in *Rhodobacter capsulatus* by redox and photosystem regulators RegA, CrtJ, FnrL and AerR. *J Mol Biol*. 2004; 342: 1171

**Sohlenkamp C, López-Lara IM, Geiger O:** Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res*. 2003; 42(2):115

**Solomon PS, Shaw AL, Lane I, Hanson GR, Palmer T, McEwan AG:** Characterization of a molybdenum cofactor biosynthetic gene cluster in *Rhodobacter capsulatus* which is specific for the biogenesis of dimethylsulfoxide reductase. *Microbiology* 1999; 145: 1421

**Song JH, Murphy RJ, Narayan R, Davies GB:** Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364(1526):2127

**Sørensen HP, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK:** Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck. *J Chromatogr B*, 2003; 786: 207

**Sørensen HP, Mortensen KK:** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2005; 115:113

**Sperling P, Lee M, Girke T, Zähringer U, Stymne S, Heinz E:** A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b5 superfamily. *Eur J Biochem.* 2000; 267(12):3801

**Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G:** Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol Rev.* 1971; 35(2):171

**Stöveken T, Steinbüchel A:** Bacterial acyltransferases as an alternative for lipase-catalyzed acylation for the production of oleochemicals and fuels. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008; 47(20):3688

**Strandberg L, Enfors SO:** Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(6): 1669

**Strnad H, Lapidus A, Paces J, Ulbrich P, Vlcek C, Paces V, Haselkorn R:** Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *J Bacteriol.* 2010 (doi:10.1128/JB.00366-10)

**Studier FW, Moffatt BA:** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986; 189: 113

**Suga K, Honjoh K, Furuya N, Shimizu H, Nishi K, Shinohara F, Hirabaru Y, Maruyama I, Miyamoto T, Hatano S, Iio M:** Two low-temperature-inducible *Chlorella* genes for delta12 and omega-3 fatty acid desaturase (FAD): isolation of delta12 and omega-3 fad cDNA clones, expression of delta12 fad in *Saccharomyces cerevisiae*, and expression of omega-3 fad in *Nicotiana tabacum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002; 66(6):1314

**Suzuki CK, Rep M, van Dijl JM, Suda K, Grivell LA, Schatz G:** ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22(4):118

**Tabita FR:** The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO<sub>2</sub> fixation in purple bacteria

*In:* Robert E. Blankenship, Michael T. Madigan, Carl E. Bauer (Ed.) - *Advances in Photosynthesis – Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Kluwer Academic Publishers), 1995

**Tabor S, Richardson CC:** A bacteriophage T7 RNA polymerase/ promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 1074

**Takeuchi K, Reue K:** Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296(6):E1195

**Tanaka H, Tamai E, Miyata S, Taniguchi Y, Nariya H, Hatano N, Houchi H, Okabe A:** Construction and characterization of a clostripain-like protease-deficient mutant of *Clostridium perfringens* as a strain for clostridial gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 77(5):1063

**Taylor DC, Francis T, Guo Y, Brost JM, Katavic V, Mietkiewska E, Michael Giblin E, Lozinsky S, Hoffman T:** Molecular cloning and characterization of a KCS gene from *Cardamine graeca* and its

heterologous expression in *Brassica* oilseeds to engineer high nervonic acid oils for potential medical and industrial use. *Plant Biotechnol J*. 2009; 7(9):925

**Terpe K:** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006; 72(2):211

**Tomoyasu T, Mogk A, Langen H, Goloubinoff P, Bukau B:** Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol*. 2001; 40(2):397

**Tsai JH, Chen SJ, Huang KL, Lin YC, Lee WJ, Lin CC, Lin WY:** PM, carbon, and PAH emissions from a diesel generator fuelled with soy-biodiesel blends. *J Hazard Mater*. 2010; 179(1-3):237

**Upchurch RG:** Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett*. 2008; 30(6):967

**Van Gerpen J:** Biodiesel: small scale production and quality requirements. *Methods Mol Biol*. 2009; 581:281

**Van Melder L, Aertsen A:** Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Res Microbiol*. 2009; 160(9):645

**Veen M, Lang C:** Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 63(6):635

**Vasseur-Godbillon C, Hamdane D, Marden MC, Baudin-Creuzat V:** High-yield expression in *Escherichia coli* of soluble human  $\alpha$ -hemoglobin complexed with its molecular chaperone. *Protein Eng. Des. Sel*. 2006; 19(3): 91

**Venegas-Calderón M, Sayanova O, Napier JA:** An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2010; 49(2):108

**Vignais PM, Dimon B, Zorin NA, Tomiyama M, Colbeau A:** Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H<sub>2</sub>-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. 2000; 182(21): 5997

**Villaverde A, Carrió MM:** Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*. 2003; 25: 1385

**Voelker T, Kinney AJ:** Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001; 52:335

**Volontè F, Marinelli F, Gastaldo L, Sacchi S, Pilone MS, Pollegioni L, Molla G:** Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 2008; 61(2):131

**Wada H, Murata N:** The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth Res*. 2007; 92(2):205

**Wagner S, Baars L, Ytterberg AJ, Klussmeier A, Wagner CS, Nord O, Nygren PA, van Wijk KJ, de Gier J-W:** Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6(9):1527

- Wall JG, Plückthun A:** Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1995; 6: 507
- Wallis JG, Browse J:** Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res*. 2002; 41(3):254
- Wallis JG, Browse J:** Lipid biochemists salute the genome. *Plant J*. 2010; 61(6):1092
- Wältermann M, Stöveken T, Steinbüchel A:** Key enzymes for biosynthesis of neutral lipid storage compounds in prokaryotes: properties, function and occurrence of wax ester synthases/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferases. *Biochimie*. 2007; 89(2):230
- Wang G, Angermüller S, Klipp W:** Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. *J Bacteriol*. 1993; 175(10): 3031
- Wang H, Cronan JE:** Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues. *J Biol Chem*. 2004; 279(33):34489
- Wang X, Li X, Zhang Z, Shen X, Zhong F:** Codon optimization enhances secretory expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 2010; 72(1):101
- Warude D, Joshi K, Harsulkar A:** Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*. 2006; 26(2):83
- Watanabe S, Kanada S, Takenaka M, Hamazaki T:** Dietary n-3 fatty acids selectively attenuate LPS-induced behavioral depression in mice. *Physiol Behav*. 2004; 81(4):605
- Watanabe T, Tsuda S, Nishimura H, Honda Y, Watanabe T:** Characterization of a Delta12-fatty acid desaturase gene from *Ceriporiopsis subvermispota*, a selective lignin-degrading fungus. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 (10.1007/s00253-010-2438-1)
- Wawrzynow A, Banecki B, Zylicz M:** The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol Microbiol*. 1996; 21(5):895
- Weathers PJ, Towler MJ, Xu J:** Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85(5):1339
- Weaver PF, Wall JD, Gest H:** Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol*. 1975; 105: 207
- Weber W, Fussenegger M:** Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2007; 18(5):399
- Weber CF, King GM:** Physiological, ecological, and phylogenetic characterization of *Stappia*, a marine CO-oxidizing bacterial genus. *Appl Env Microbiol*. 2007, 73(4): 1266
- Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, Olins PO:** Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7: 494

- Welch M, Govindarajan S, Ness JE, Villalobos A, Gurney A, Minshull J, Gustafsson C:** Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2009; 4(9):e7002
- Westers L, Westers H, Quax WJ:** *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1694(1-3):299
- Westers L, Westers H, Zanen G, Antelmann H, Hecker M, Noone D, Devine KM, van Dijl JM, Quax WJ:** Genetic or chemical protease inhibition causes significant changes in the *Bacillus subtilis* exoproteome. *Proteomics*. 2008; 8(13):2704
- White SW, Zheng J, Zhang Y-M, Rock CO:** The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74: 791
- White B:** Dietary fatty acids. *Am Fam Physician*. 2009; 80(4):345
- Whitney HM, Sayanova O, Pickett JA, Napier JA:** Isolation and expression pattern of two putative acyl-ACP desaturase cDNAs from *Bassia scoparia*. *J Exp Bot*. 2004; 55(397):787
- Wiberg E, Banas A, Stymne S:** Fatty acid distribution and lipid metabolism in developing seeds of laurate-producing rape (*Brassica napus* L.). *Planta*. 1997; 203(3):341
- Wiethaus J, Müller A, Neumann M, Neumann S, Leimkühler S, Narberhaus F, Masepohl B:** Specific interactions between four molybdenum-binding proteins contribute to Mo-dependent gene regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. 2009; 191(16):5205
- Wu LF, Saier MH Jr:** Nucleotide sequence of the *fruA* gene, encoding the fructose permease of the *Rhodobacter capsulatus* phosphotransferase system, and analyses of the deduced protein sequence. *J Bacteriol*. 1990; 172(12):7167
- Wu WF, Zhou Y, Gottesman S:** Redundant *in vivo* proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) protease. *J Bacteriol*. 1999; 181(12):3681
- Wu G, Truksa M, Datla N, Vrinten P, Bauer J, Zank T, Cirpus P, Heinz E, Qiu X:** Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nat Biotechnol*. 2005; 23(8):1013
- Wycuff DR, Matthews KS:** Generation of an *araC-araBAD* promoter-regulated T7-expression system. *Anal Biochem*. 2000; 277:67
- Xu LY, Link AJ:** Stress responses to heterologous membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*. 2009; 31(11):1775
- Xu J, Matthews KS:** Flexibility in the inducer binding region is crucial for allostery in the *Escherichia coli* lactose repressor. *Biochemistry*. 2009; 48(22): 4988
- Yakamavich JA, Baker TA, Sauer RT:** Asymmetric nucleotide transactions of the HslUV protease. *J Mol Biol*. 2008; 380(5):946
- Zahn K:** Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J Bacteriol*. 1996; 178(10): 2926

- Zannoni D:** Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria. *In:* Robert E. Blankenship, Michael T. Madigan, Carl E. Bauer (Ed.) - *Advances in Photosynthesis – Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Kluwer Academic Publishers), 1995
- Zerbs S, Frank AM, Collart FR:** Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods Enzymol.* 2009;463:149
- Zevenbergen H, de Bree A, Zeelenberg M, Laitinen K, van Duijn G, Flöter E:** Foods with a high fat quality are essential for healthy diets. *Ann Nutr Metab.* 2009; 54 Suppl 1:15
- Zhang Y-M, White SW, Rock CO:** Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem.* 2006a; 281(26):17541
- Zhang H, Wang P, Qi Q:** Molecular effect of FadD on the regulation and metabolism of fatty acid in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006b; 259(2):249
- Zhang YM, Rock CO:** Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008a; 6(3):222
- Zhang YM, Rock CO:** Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res.* 2008b; 49(9):1867
- Zhang YM, Rock CO:** Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J Lip Res.* 2009; April Supplement: S115
- Zhang X, Wei D, Li M, Qi Y, Xing L:** Evolution-related amino acids play important role in determining regioselectivity of fatty acid desaturase from *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep.* 2009; 36(3):567
- Zhu K, Choi KH, Schweizer HP, Rock CO, Zhang YM:** Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2006; 60(2):260
- Zhu K, Zhang YM, Rock CO:** Transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2009; 284(50):34880
- Zolkiewski M:** A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol Microbiol.* 2006; 61(5):1094
- Zweers JC, Barák I, Becher D, Driessen AJ, Hecker M, Kontinen VP, Saller MJ, Vavrová L, van Dijl JM:** Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microb Cell Fact.* 2008; 7:10

## VIII Anhang

## 1. Ausbeuten der Fettsäuremethylester bei den gaschromatographischen Analysen

Tab. VII-1: Ausbeuten der Fettsäuremethylester aus Membranen von *R. capsulatus* nach der Aufnahme von Ölsäure als freier Ölsäure und Ölsäure-Natriumsalz. Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1}$   $\text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente                | Ohne Fettsäure   |   | Freie Ölsäure  |   | Ölsäure-Natriumsalz  |   |
|---------------------------|--|---|--|---|--|---|
|                           | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
| $\leq \text{C15:0}$       | 0,28<br>( $\pm 0,08$ )                                     | 0,42<br>( $\pm 0,11$ )                                      | 1,26<br>( $\pm 0,64$ )                                     | 0,65<br>( $\pm 0,28$ )                                      | 2,35<br>( $\pm 0,83$ )                                     | 1,12<br>( $\pm 0,21$ )                                      |
| C16:0                     | 0,14<br>( $\pm 0,02$ )                                     | 0,22<br>( $\pm 0,02$ )                                      | 0,59<br>( $\pm 0,34$ )                                     | 0,30<br>( $\pm 0,14$ )                                      | 1,05<br>( $\pm 0,26$ )                                     | 0,51<br>( $\pm 0,07$ )                                      |
| C18:0                     | 0,15<br>( $\pm 0,03$ )                                     | 0,23<br>( $\pm 0,05$ )                                      | 1,20<br>( $\pm 0,62$ )                                     | 0,63<br>( $\pm 0,25$ )                                      | 2,40<br>( $\pm 0,80$ )                                     | 1,15<br>( $\pm 0,24$ )                                      |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,08<br>( $\pm 0,01$ )                                     | 0,12<br>( $\pm 0,01$ )                                      | 0,22<br>( $\pm 0,07$ )                                     | 0,11<br>( $\pm 0,02$ )                                      | 0,14<br>( $\pm 0,01$ )                                     | 0,07<br>( $\pm 0,01$ )                                      |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 2,64<br>( $\pm 0,26$ )                                     | 4,01<br>( $\pm 0,11$ )                                      | 4,20<br>( $\pm 0,28$ )                                     | 2,30<br>( $\pm 0,43$ )                                      | 3,48<br>( $\pm 0,46$ )                                     | 1,72<br>( $\pm 0,36$ )                                      |
| C18:1 $\Delta 9$          | n.n.   | n.n.  | 1,84<br>( $\pm 0,15$ )                                     | 1,01<br>( $\pm 0,21$ )                                      | 0,90<br>( $\pm 0,12$ )                                     | 0,44<br>( $\pm 0,08$ )                                      |
| Gesamt-<br>ausbeute       | 3,30<br>( $\pm 0,39$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 0,28$ )                                      | 9,30<br>( $\pm 2,11$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 1,33$ )                                      | 10,31<br>( $\pm 2,47$ )                                    | 5,00<br>( $\pm 0,97$ )                                      |

**Tab. VII-2: Ausbeuten der Fettsäuremethylester aus Membranen von *R. capsulatus* nach der Aufnahme von Linolsäure als freier Linolsäure und Linolsäure-Natriumsalz.** Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente                | Ohne Fettsäure   |   | Freie Linolsäure   |   | Linolsäure-Natriumsalz                                     |   |
|---------------------------|--|---|--|---|--|---|
|                           | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
| $\leq \text{C15:0}$       | 0,28<br>( $\pm 0,08$ )                                     | 0,42<br>( $\pm 0,11$ )                                      | 0,31<br>( $\pm 0,18$ )                                     | 0,26<br>( $\pm 0,06$ )                                      | 0,35<br>( $\pm 0,19$ )                                     | 0,15<br>( $\pm 0,03$ )                                      |
| C16:0                     | 0,14<br>( $\pm 0,02$ )                                     | 0,22<br>( $\pm 0,02$ )                                      | 0,14<br>( $\pm 0,02$ )                                     | 0,12<br>( $\pm 0,04$ )                                      | 0,36<br>( $\pm 0,17$ )                                     | 0,15<br>( $\pm 0,02$ )                                      |
| C18:0                     | 0,15<br>( $\pm 0,03$ )                                     | 0,23<br>( $\pm 0,05$ )                                      | 0,17<br>( $\pm 0,09$ )                                     | 0,17<br>( $\pm 0,12$ )                                      | 0,22<br>( $\pm 0,20$ )                                     | 0,08<br>( $\pm 0,03$ )                                      |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,08<br>( $\pm 0,01$ )                                     | 0,12<br>( $\pm 0,01$ )                                      | 0,04<br>( $\pm 0,02$ )                                     | 0,03<br>( $\pm 0,00$ )                                      | 0,18<br>( $\pm 0,10$ )                                     | 0,07<br>( $\pm 0,01$ )                                      |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 2,64<br>( $\pm 0,26$ )                                     | 4,01<br>( $\pm 0,11$ )                                      | 3,75<br>( $\pm 1,75$ )                                     | 3,01<br>( $\pm 0,09$ )                                      | 9,16<br>( $\pm 5,10$ )                                     | 2,82<br>( $\pm 0,14$ )                                      |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 0,28<br>( $\pm 0,08$ )                                     | 0,42<br>( $\pm 0,11$ )                                      | 0,31<br>( $\pm 0,18$ )                                     | 0,26<br>( $\pm 0,06$ )                                      | 0,35<br>( $\pm 0,19$ )                                     | 0,15<br>( $\pm 0,03$ )                                      |
| C18:2 $\Delta 9,12$       | n.n.   | n.n.  | 1,76<br>( $\pm 0,90$ )                                     | 1,40<br>( $\pm 0,10$ )                                      | 1,74<br>( $\pm 1,08$ )                                     | 0,72<br>( $\pm 0,20$ )                                      |
| Gesamt-<br>ausbeute       | 3,30<br>( $\pm 0,39$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 0,28$ )                                      | 6,17<br>( $\pm 2,96$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 0,42$ )                                      | 12,01<br>( $\pm 6,84$ )                                    | 5,00<br>( $\pm 0,43$ )                                      |

**Tab. VII-3: Veränderungen in der Fettsäuren-Zusammensetzung der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 durch Cerulenin.** Angaben in  $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ . Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente          | Cerulenin-Konzentration |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        |
|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                     | 0 $\mu\text{g/ml}$      |                        | 1,5 $\mu\text{g/ml}$   |                        | 3 $\mu\text{g/ml}$     |                        | 4,5 $\mu\text{g/ml}$   |                        | 6 $\mu\text{g/ml}$     |                        |
|                     | Abs.                    | Norm.                  | Abs.                   | Norm.                  | Abs.                   | Norm.                  | Abs.                   | Norm.                  | Abs.                   | Norm.                  |
| $\leq \text{C15:0}$ | 0,12<br>( $\pm 0,09$ )  | 0,20<br>( $\pm 0,14$ ) | 0,34<br>( $\pm 0,45$ ) | 0,20<br>( $\pm 0,14$ ) | 0,63<br>( $\pm 0,32$ ) | 0,49<br>( $\pm 0,14$ ) | 2,11<br>( $\pm 1,46$ ) | 1,02<br>( $\pm 0,70$ ) | 2,55<br>( $\pm 2,16$ ) | 0,96<br>( $\pm 0,83$ ) |
| C12:0               | n.n.                    | n.n.                   | 0,04<br>( $\pm 0,03$ ) | 0,4<br>( $\pm 0,04$ )  | n.n.                   | n.n.                   | n.n.                   | n.n.                   | n.n.                   | n.n.                   |

|                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                   |                  |                   |                  |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| C14:0               | n.n.             | n.n.             | 0,02<br>(± 0,01) | 0,03<br>(± 0,03) | 0,08<br>(± 0,14) | 0,08<br>(± 0,13) | 0,22<br>(± 0,19)  | 0,11<br>(± 0,09) | 0,68<br>(± 0,32)  | 0,32<br>(± 0,09) |
| C16:0               | 0,12<br>(± 0,06) | 0,20<br>(± 0,08) | 0,44<br>(± 0,25) | 0,59<br>(± 0,11) | 1,62<br>(± 0,41) | 1,30<br>(± 0,07) | 2,40<br>(± 0,44)  | 1,14<br>(± 0,16) | 2,52<br>(± 1,95)  | 1,22<br>(± 0,96) |
| C18:0               | 0,11<br>(± 0,04) | 0,18<br>(± 0,05) | 0,60<br>(± 0,55) | 0,75<br>(± 0,38) | 2,12<br>(± 0,65) | 1,68<br>(± 0,09) | 3,82<br>(± 1,02)  | 1,81<br>(± 0,41) | 4,96<br>(± 5,88)  | 1,44<br>(± 1,29) |
| C16:1 Δ9            | 0,07<br>(± 0,01) | 0,11<br>(± 0,01) | 0,60<br>(± 0,55) | 0,07<br>(± 0,06) | n.n.             | n.n.             | n.n.              | n.n.             | n.n.              | n.n.             |
| C18:1 Δ11c          | 2,60<br>(± 0,14) | 4,31<br>(± 0,12) | 2,20<br>(± 0,68) | 3,15<br>(± 0,74) | 1,79<br>(± 0,30) | 1,45<br>(± 0,16) | 1,90<br>(± 0,52)  | 0,92<br>(± 0,27) | 1,68<br>(± 0,21)  | 1,05<br>(± 0,84) |
| Gesamt-<br>ausbeute | 3,02<br>(± 0,24) | 5,00<br>(± 0,40) | 3,70<br>(± 2,93) | 5,00<br>(± 1,79) | 6,25<br>(± 2,93) | 5,00<br>(± 0,59) | 10,45<br>(± 0,55) | 5,00<br>(± 1,64) | 12,39<br>(± 9,47) | 5,00<br>(± 4,00) |

**Tab. VII-4: Der Effekt von Cerulenin auf die Aufnahme exogener Ölsäure aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus* B10S-T7.** Angaben in  $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ . Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Kompo-<br>nente     | Cerulenin-Konzentration |                  |                      |                  |                    |                  |                      |                  |                    |                  |
|---------------------|-------------------------|------------------|----------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------------|------------------|--------------------|------------------|
|                     | 0 $\mu\text{g/ml}$      |                  | 1,5 $\mu\text{g/ml}$ |                  | 3 $\mu\text{g/ml}$ |                  | 4,5 $\mu\text{g/ml}$ |                  | 6 $\mu\text{g/ml}$ |                  |
|                     | Abs.                    | Norm.            | Abs.                 | Norm.            | Abs.               | Norm.            | Abs.                 | Norm.            | Abs.               | Norm.            |
| ≤ C15:0             | 0,08<br>(± 0,01)        | 0,26<br>(± 0,20) | n.n.                 | n.n.             | n.n.               | n.n.             | n.n.                 | n.n.             | n.n.               | n.n.             |
| C15:0               | 0,13<br>(± 0,15)        | 0,16<br>(± 0,18) | 0,19<br>(± 0,07)     | 0,27<br>(± 0,13) | 1,46<br>(± 0,50)   | 1,09<br>(± 0,37) | 2,16<br>(± 2,27)     | 2,61<br>(± 0,71) | 4,44<br>(± 1,99)   | 1,82<br>(± 0,41) |
| C16:0               | 0,06<br>(± 0,04)        | 0,08<br>(± 0,04) | 0,44<br>(± 0,04)     | 0,62<br>(± 0,03) | 2,53<br>(± 0,53)   | 1,88<br>(± 0,37) | 0,48<br>(± 0,14)     | 0,96<br>(± 0,68) | 2,19<br>(± 0,25)   | 0,97<br>(± 0,22) |
| C18:0               | 0,15<br>(± 0,09)        | 0,19<br>(± 0,11) | 0,34<br>(± 0,01)     | 0,48<br>(± 0,07) | 2,78<br>(± 0,79)   | 2,02<br>(± 0,30) | 1,05<br>(± 0,93)     | 1,43<br>(± 0,03) | 5,08<br>(± 1,18)   | 2,20<br>(± 0,20) |
| C16:1 Δ9            | 0,08<br>(± 0,07)        | 0,10<br>(± 0,08) | n.n.                 | n.n.             | n.n.               | n.n.             | n.n.                 | n.n.             | n.n.               | n.n.             |
| C18:1 Δ11c          | 2,62<br>(± 0,31)        | 3,42<br>(± 0,16) | 1,63<br>(± 0,28)     | 2,29<br>(± 0,13) | n.n.               | n.n.             | n.n.                 | n.n.             | n.n.               | n.n.             |
| C18:1 Δ9            | 0,92<br>(± 0,31)        | 1,41<br>(± 0,07) | 0,95<br>(± 0,28)     | 1,34<br>(± 0,08) | n.n.               | n.n.             | n.n.                 | n.n.             | n.n.               | n.n.             |
| Gesamt-<br>ausbeute | 4,05<br>(± 0,52)        | 5,00<br>(± 0,67) | 3,54<br>(± 0,45)     | 5,00<br>(± 0,43) | 6,77<br>(± 1,62)   | 5,00<br>(± 1,05) | 3,69<br>(± 3,33)     | 5,00<br>(± 1,42) | 11,70<br>(± 3,34)  | 5,00<br>(± 0,82) |

**Tab. VII-5: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran nach der Aufnahme exogener cis-Vaccensäure aus dem Kulturmedium durch *R. capsulatus* B10S-T7.** Standardabweichungen in Klammern. (Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente                | ohne Cerulenin  |  | mit Cerulenin   |  |
|---------------------------|---|--|---|--|
|                           | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
| $\leq \text{C15:0}$       | 0,72 ( $\pm 0,22$ )                                   | 0,58 ( $\pm 0,16$ )                                    | 0,58 ( $\pm 0,15$ )                                   | 0,66 ( $\pm 0,17$ )                                    |
| C16:0                     | 0,55 ( $\pm 0,08$ )                                   | 0,44 ( $\pm 0,05$ )                                    | 0,78 ( $\pm 0,11$ )                                   | 0,89 ( $\pm 0,08$ )                                    |
| C18:0                     | 0,89 ( $\pm 0,23$ )                                   | 0,71 ( $\pm 0,15$ )                                    | 0,40 ( $\pm 0,17$ )                                   | 0,45 ( $\pm 0,17$ )                                    |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,14 ( $\pm 0,02$ )                                   | 0,11 ( $\pm 0,02$ )                                    | 0,15 ( $\pm 0,01$ )                                   | 0,18 ( $\pm 0,01$ )                                    |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 3,90 ( $\pm 0,23$ )                                   | 3,15 ( $\pm 0,28$ )                                    | 2,45 ( $\pm 0,04$ )                                   | 2,81 ( $\pm 0,15$ )                                    |
| Gesamtausbeute            | 6,19 ( $\pm 0,77$ )                                   | 5,00 ( $\pm 0,66$ )                                    | 4,38 ( $\pm 0,50$ )                                   | 5,00 ( $\pm 0,60$ )                                    |

**Tab. VII-6: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von *R. capsulatus* nach der Aufnahme exogener Ölsäure.** Standardabweichungen in Klammern. (Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf die Vergleichskulturen; n.n. = nicht nachweisbar).

| Komponente                | Ohne Cerulenin  |  | Mit Cerulenin   |  |
|---------------------------|---|--|---|--|
|                           | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
| $\leq \text{C15:0}$       | 1,07 ( $\pm 0,28$ )                                   | 0,78 ( $\pm 0,28$ )                                    | 0,59 ( $\pm 0,25$ )                                   | 0,76 ( $\pm 0,37$ )                                    |
| C16:0                     | 0,58 ( $\pm 0,15$ )                                   | 0,41 ( $\pm 0,15$ )                                    | 0,78 ( $\pm 0,10$ )                                   | 1,03 ( $\pm 0,03$ )                                    |
| C18:0                     | 1,03 ( $\pm 0,38$ )                                   | 0,74 ( $\pm 0,38$ )                                    | 0,29 ( $\pm 0,23$ )                                   | 0,37 ( $\pm 0,25$ )                                    |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,03 ( $\pm 0,02$ )                                   | 0,02 ( $\pm 0,02$ )                                    | n.n.  | n.n.   |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 3,17 ( $\pm 0,06$ )                                   | 2,33 ( $\pm 0,06$ )                                    | 0,81 ( $\pm 0,03$ )                                   | 1,09 ( $\pm 0,12$ )                                    |
| C18:1 $\Delta 9$          | 0,98 ( $\pm 0,11$ )                                   | 0,72 ( $\pm 0,11$ )                                    | 1,30 ( $\pm 0,07$ )                                   | 1,74 ( $\pm 0,15$ )                                    |
| Gesamtausbeute            | 6,86 ( $\pm 1,01$ )                                   | 5,00 ( $\pm 1,01$ )                                    | 3,77 ( $\pm 0,68$ )                                   | 5,00 ( $\pm 0,72$ )                                    |

**Tab. VII-7: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von *R. capsulatus* B10S-T7 nach der Aufnahme exogener Linolsäure.** Standardabweichungen in Klammern. (Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf Kontrolle ohne Cerulenin)

| Komponente | ohne Cerulenin |       | mit Cerulenin |       |
|------------|----------------|-------|---------------|-------|
|            | Abs.           | Norm. | Abs.          | Norm. |

## Anhang

|                           | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
|---------------------------|---|---|---|---|
| $\leq \text{C15:0}$       | 0,70 ( $\pm 0,68$ )                           | 0,77 ( $\pm 0,26$ )                           | 0,61 ( $\pm 0,16$ )                           | 0,89 ( $\pm 0,47$ )                           |
| C16:0                     | 0,48 ( $\pm 0,43$ )                           | 0,52 ( $\pm 0,12$ )                           | 0,66 ( $\pm 0,37$ )                           | 0,81 ( $\pm 0,15$ )                           |
| C18:0                     | 0,79 ( $\pm 0,69$ )                           | 0,86 ( $\pm 0,14$ )                           | 0,84 ( $\pm 0,06$ )                           | 0,53 ( $\pm 0,18$ )                           |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,01 ( $\pm 0,02$ )                           | 0,01 ( $\pm 0,02$ )                           | 0,03 ( $\pm 0,05$ )                           | 0,02 ( $\pm 0,04$ )                           |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 1,88 ( $\pm 1,67$ )                           | 2,05 ( $\pm 0,33$ )                           | 0,65 ( $\pm 0,41$ )                           | 0,79 ( $\pm 0,29$ )                           |
| C18:2 $\Delta 9,12$       | 0,72 ( $\pm 0,63$ )                           | 0,78 ( $\pm 0,11$ )                           | 1,45 ( $\pm 0,53$ )                           | 1,91 ( $\pm 0,46$ )                           |
| Gesamtausbeute            | 4,57 ( $\pm 4,11$ )                           | 5,00 ( $\pm 0,97$ )                           | 4,27 ( $\pm 1,61$ )                           | 5,00 ( $\pm 1,64$ )                           |

**Tab. VII-8: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in Membranen von *R. capsulatus* nach der Aufnahme konjugierter Linolsäure aus dem Kulturmedium.** Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von 5  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{OD}_{660}^{-1}$ ).

| Fettsäure                 | Freie CLA  |   |  |   | CLA Triglycerid  |   |  |   |
|---------------------------|--|---|--|---|--|---|--|---|
|                           | Ohne Cerulenin   |   | Mit Cerulenin  |   | Ohne Cerulenin   |   | Mit Cerulenin  |   |
|                           | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Abs.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] | Norm.<br>[ $\mu\text{g L}^{-1}$<br>$\text{OD}_{660}^{-1}$ ] |
| $\leq \text{C15:0}$       | 0,30<br>( $\pm 0,22$ )                                     | 1,43<br>( $\pm 0,30$ )                                      | 2,75<br>( $\pm 1,01$ )                                     | 2,77<br>( $\pm 0,48$ )                                      | 0,89<br>( $\pm 0,28$ )                                     | 1,05<br>( $\pm 0,20$ )                                      | 0,27<br>( $\pm 0,32$ )                                     | 0,50<br>( $\pm 0,44$ )                                      |
| C16:0                     | 0,12<br>( $\pm 0,10$ )                                     | 0,54<br>( $\pm 0,21$ )                                      | 1,21<br>( $\pm 0,39$ )                                     | 1,24<br>( $\pm 0,28$ )                                      | 0,44<br>( $\pm 0,12$ )                                     | 0,50<br>( $\pm 0,07$ )                                      | 0,48<br>( $\pm 0,39$ )                                     | 1,18<br>( $\pm 0,10$ )                                      |
| C18:0                     | 0,28<br>( $\pm 0,24$ )                                     | 1,28<br>( $\pm 0,47$ )                                      | 1,18<br>( $\pm 1,03$ )                                     | 0,94<br>( $\pm 0,62$ )                                      | 0,88<br>( $\pm 0,20$ )                                     | 1,01<br>( $\pm 0,11$ )                                      | 1,15<br>( $\pm 1,34$ )                                     | 2,25<br>( $\pm 0,80$ )                                      |
| C16:1 $\Delta 9$          | n.n.   | n.n.  | n.n.   | n.n.  | 0,05<br>( $\pm 0,02$ )                                     | 0,05<br>( $\pm 0,01$ )                                      | n.n.   | n.n.  |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 0,28<br>( $\pm 0,06$ )                                     | 1,75<br>( $\pm 0,95$ )                                      | 0,05<br>( $\pm 0,08$ )                                     | 0,04<br>( $\pm 0,07$ )                                      | 2,10<br>( $\pm 0,52$ )                                     | 2,39<br>( $\pm 0,27$ )                                      | 0,22<br>( $\pm 0,19$ )                                     | 1,07<br>( $\pm 0,95$ )                                      |
| CLA                       | 0,01<br>( $\pm 0,01$ )                                     | 0,02<br>( $\pm 0,4$ )                                       | n.n.   | n.n.  | 0,01<br>( $\pm 0,01$ )                                     | 0,05<br>( $\pm 0,01$ )                                      | n.n.   | n.n.  |
| Gesamt-<br>ausbeute       | 0,98<br>( $\pm 0,63$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 1,93$ )                                      | 5,19<br>( $\pm 2,51$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 1,46$ )                                      | 4,36<br>( $\pm 1,15$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 0,66$ )                                      | 2,13<br>( $\pm 2,25$ )                                     | 5,00<br>( $\pm 2,30$ )                                      |

**Tab. VII-9: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von *R. capsulatus* nach der Aufnahme exogener EPA und DHA I.** Standardabweichungen in Klammern. (EPA = Eicosapentaensäure; DHA = Docosahexaensäure; PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäure; n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeuten; Norm. = Ausbeuten normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente          | A  |                        |   |                        | B  |                        |   |                        |
|---------------------|--|------------------------|---|------------------------|--|------------------------|---|------------------------|
|                     | 33% EPA & 26% DHA<br>(PUFA-Ethylester)                             |                        |   |                        | 34% EPA & 26% DHA<br>(PUFA-Ethylester)                             |                        |   |                        |
|                     | Ohne<br>Cerulenin<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | Mit<br>Cerulenin<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | Ohne<br>Cerulenin<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | Mit<br>Cerulenin<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        |
|                     | Abs.   | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  | Abs.   | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  |
| $\leq \text{C15:0}$ | 0,37<br>( $\pm 0,32$ )   | 0,51<br>( $\pm 0,39$ ) | 0,63<br>( $\pm 0,83$ )  | 1,05<br>( $\pm 1,17$ ) | 0,25<br>( $\pm 0,11$ )   | 0,98<br>( $\pm 0,51$ ) | 2,56<br>( $\pm 0,61$ )  | 2,74<br>( $\pm 1,10$ ) |
| C16:0               | 0,23<br>( $\pm 0,05$ )   | 0,34<br>( $\pm 0,04$ ) | 0,48<br>( $\pm 0,09$ )  | 1,08<br>( $\pm 0,38$ ) | 0,12<br>( $\pm 0,02$ )   | 0,47<br>( $\pm 0,07$ ) | 1,25<br>( $\pm 0,34$ )  | 1,26<br>( $\pm 0,07$ ) |
| C18:0               | 1,81<br>( $\pm 0,45$ )   | 1,13<br>( $\pm 0,39$ ) | 1,16<br>( $\pm 0,18$ )  | 2,56<br>( $\pm 0,68$ ) | 0,19<br>( $\pm 0,01$ )   | 0,76<br>( $\pm 0,15$ ) | 1,11<br>( $\pm 1,20$ )  | 0,97<br>( $\pm 0,83$ ) |
| C16:1 $\Delta 9$    | 0,01<br>( $\pm 0,03$ )   | 0,02<br>( $\pm 0,04$ ) | n.n.  | n.n.                   | 0,01<br>( $\pm 0,02$ )   | 0,03<br>( $\pm 0,06$ ) | n.n.  | n.n.                   |
| C18:1 $\Delta 11c$  | 1,62<br>( $\pm 0,33$ )   | 2,36<br>( $\pm 0,48$ ) | 0,14<br>( $\pm 0,03$ )  | 0,31<br>( $\pm 0,11$ ) | 0,60<br>( $\pm 0,20$ )   | 2,32<br>( $\pm 0,60$ ) | 0,03<br>( $\pm 0,05$ )  | 0,02<br>( $\pm 0,04$ ) |
| C20:5               | 0,23<br>( $\pm 0,20$ )   | 0,39<br>( $\pm 0,34$ ) | n.n.  | n.n.                   | 0,07<br>( $\pm 0,08$ )   | 0,24<br>( $\pm 0,29$ ) | n.n.  | n.n.                   |
| C20:6               | 0,15<br>( $\pm 0,13$ )   | 0,25<br>( $\pm 0,23$ ) | n.n.  | n.n.                   | 0,05<br>( $\pm 0,06$ )   | 0,20<br>( $\pm 0,24$ ) | n.n.  | n.n.                   |
| Gesamt-<br>ausbeute | 3,44<br>( $\pm 1,52$ )   | 5,00<br>( $\pm 1,15$ ) | 2,41<br>( $\pm 1,14$ )  | 5,00<br>( $\pm 2,34$ ) | 1,28<br>( $\pm 0,50$ )   | 5,00<br>( $\pm 1,92$ ) | 4,95<br>( $\pm 2,20$ )  | 5,00<br>( $\pm 2,04$ ) |

**Tab. VII-10: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von *R. capsulatus* nach der Aufnahme exogener EPA und DHA.** Standardabweichungen in Klammern. (EPA = Eicosapentaensäure; DHA = Docosahexaensäure; n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente                | 34% EPA & 26% DHA<br>(freie Fettsäuren)                            |                        |   |                        |
|---------------------------|--|------------------------|---|------------------------|
|                           | Ohne<br>Cerulenin<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | Mit<br>Cerulenin<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        |
|                           | Abs.   | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  |
|                           | $\leq \text{C15:0}$  | 0,12<br>( $\pm 0,15$ ) | 0,36<br>( $\pm 0,75$ )  | 0,37<br>( $\pm 0,24$ ) |
| C16:0                     | 0,07<br>( $\pm 0,05$ )   | 0,25<br>( $\pm 0,25$ ) | 0,41<br>( $\pm 0,16$ )  | 1,08<br>( $\pm 0,42$ ) |
| C18:0                     | 0,22<br>( $\pm 0,13$ )   | 0,85<br>( $\pm 0,65$ ) | 0,93<br>( $\pm 0,45$ )  | 2,36<br>( $\pm 1,18$ ) |
| C16:1 $\Delta 9$          | 0,003<br>( $\pm 0,01$ )  | 0,02<br>( $\pm 0,03$ ) | n.n.  | n.n.                   |
| C18:1 $\Delta 11\text{c}$ | 0,84<br>( $\pm 0,24$ )   | 3,52<br>( $\pm 1,20$ ) | 0,20<br>( $\pm 0,07$ )  | 0,66<br>( $\pm 0,18$ ) |
| C20:5                     | n.n.   | n.n.                   | n.n.  | n.n.                   |
| C20:6                     | n.n.   | n.n.                   | n.n.  | n.n.                   |
| Gesamt-<br>ausbeute       | 1,25<br>( $\pm 0,57$ )   | 5,00<br>( $\pm 2,85$ ) | 1,91<br>( $\pm 0,92$ )  | 5,00<br>( $\pm 2,41$ ) |

**Tab. VII-11: Ausbeuten der Fettsäure-Spezies in *R. capsulatus* B10S- $\Delta fabB$  im Vergleich mit dem Wildtyp *R. capsulatus* B10S-T7. Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )**

| Komponente          | Ohne Cerulenin   |                        |  |                        | Mit Cerulenin  |                        |  |                        |
|---------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|
|                     | B10S-T7<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | B10S- $\Delta fabB$<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | B10S-T7<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | B10S- $\Delta fabB$<br>[ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        |
|                     | Abs.   | Norm.                  | Abs.   | Norm.                  | Abs.   | Norm.                  | Abs.   | Norm.                  |
| $\leq \text{C15:0}$ | 0,12<br>( $\pm 0,09$ )                                   | 0,20<br>( $\pm 0,14$ ) | 1,15<br>( $\pm 0,25$ )   | 1,00<br>( $\pm 0,24$ ) | 0,34<br>( $\pm 0,45$ )                                   | 0,37<br>( $\pm 0,42$ ) | 16,83<br>( $\pm 4,17$ )  | 2,07<br>( $\pm 0,25$ ) |
| C14:0               | n.n.   | n.n.                   | n.n.   | n.n.                   | 0,02<br>( $\pm 0,01$ )                                   | 0,03<br>( $\pm 0,03$ ) | n.n.   | n.n.                   |
| C16:0               | 0,12<br>( $\pm 0,06$ )                                   | 0,20<br>( $\pm 0,08$ ) | 0,91<br>( $\pm 0,05$ )   | 0,80<br>( $\pm 0,02$ ) | 0,44<br>( $\pm 0,25$ )                                   | 0,59<br>( $\pm 0,11$ ) | 10,02<br>( $\pm 1,22$ )  | 1,25<br>( $\pm 0,08$ ) |
| C16:1 $\Delta 9$    | 0,07<br>( $\pm 0,01$ )                                   | 0,11<br>( $\pm 0,01$ ) | n.n.   | n.n.                   | 0,06<br>( $\pm 0,06$ )                                   | 0,07<br>( $\pm 0,06$ ) | n.n.   | n.n.                   |
| C18:0               | 0,11<br>( $\pm 0,04$ )                                   | 0,18<br>( $\pm 0,05$ ) | 0,31<br>( $\pm 0,13$ )   | 0,27<br>( $\pm 0,12$ ) | 0,60<br>( $\pm 0,55$ )                                   | 0,75<br>( $\pm 0,38$ ) | 11,71<br>( $\pm 2,08$ )  | 1,45<br>( $\pm 0,08$ ) |
| C18:1 $\Delta 11c$  | 2,60<br>( $\pm 0,14$ )                                   | 4,31<br>( $\pm 0,12$ ) | 3,36<br>( $\pm 0,49$ )   | 2,93<br>( $\pm 0,29$ ) | 2,20<br>( $\pm 0,68$ )                                   | 3,15<br>( $\pm 0,74$ ) | 1,88<br>( $\pm 0,09$ )   | 0,24<br>( $\pm 0,03$ ) |
| Gesamt-<br>ausbeute | 3,02<br>( $\pm 0,24$ )                                   | 5,00<br>( $\pm 0,40$ ) | 5,73<br>( $\pm 0,91$ )   | 5,00<br>( $\pm 0,68$ ) | 3,70<br>( $\pm 1,75$ )                                   | 5,00<br>( $\pm 1,79$ ) | 40,44<br>( $\pm 7,55$ )  | 5,00<br>( $\pm 0,44$ ) |

**Tab. VII-12: Ausbeuten der Fettsäuremethylester in der Membran von *R. capsulatus* B10S- $\Delta$ fabB nach Aufnahme von exogenen Fettsäuren.** Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht angegeben; Abs. = absolute Ausbeuten; Norm. = Ausbeuten normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ )

| Komponente          | A   |                        |   |                        | B   |                        |   |                        |
|---------------------|---|------------------------|---|------------------------|---|------------------------|---|------------------------|
|                     | Aufnahme von Ölsäure                          |                        |   |                        | Aufnahme von Linolsäure                       |                        |   |                        |
|                     | Ohne Cerulenin                                |                        | Mit Cerulenin                                 |                        | Ohne Cerulenin                                |                        | Mit Cerulenin                                 |                        |
|                     | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        |
|                     | Abs.  | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  |
| $\leq \text{C15:0}$ | 1,30<br>( $\pm 0,39$ )                        | 0,74<br>( $\pm 0,16$ ) | 10,70<br>( $\pm 2,84$ )                       | 2,52<br>( $\pm 0,90$ ) | 1,04<br>( $\pm 0,24$ )                        | 0,55<br>( $\pm 0,09$ ) | 12,18<br>( $\pm 3,83$ )                       | 3,18<br>( $\pm 0,94$ ) |
| C16:0               | 0,91<br>( $\pm 0,19$ )                        | 0,52<br>( $\pm 0,03$ ) | 2,62<br>( $\pm 3,69$ )                        | 0,41<br>( $\pm 0,44$ ) | 1,14<br>( $\pm 0,09$ )                        | 0,61<br>( $\pm 0,04$ ) | 1,06<br>( $\pm 0,32$ )                        | 0,27<br>( $\pm 0,03$ ) |
| C18:0               | 0,71<br>( $\pm 0,28$ )                        | 0,39<br>( $\pm 0,09$ ) | 5,18<br>( $\pm 3,20$ )                        | 1,07<br>( $\pm 0,48$ ) | 0,68<br>( $\pm 0,13$ )                        | 0,36<br>( $\pm 0,02$ ) | 2,03<br>( $\pm 0,61$ )                        | 0,55<br>( $\pm 0,24$ ) |
| C18:1 $\Delta$ 9    | 1,69<br>( $\pm 0,25$ )                        | 0,98<br>( $\pm 0,04$ ) | 5,02<br>( $\pm 3,45$ )                        | 1,00<br>( $\pm 0,24$ ) | n.n.  | n.n.                   | n.n.  | n.n.                   |
| C18:1 $\Delta$ 11c  | 4,10<br>( $\pm 0,48$ )                        | 2,37<br>( $\pm 0,17$ ) | n.n.  | n.n.                   | 4,01<br>( $\pm 0,45$ )                        | 2,12<br>( $\pm 0,06$ ) | 0,38<br>( $\pm 0,66$ )                        | 0,09<br>( $\pm 0,16$ ) |
| C18:2 $\Delta$ 9,12 | n.n.  | n.n.                   | n.n.  | n.n.                   | 2,59<br>( $\pm 0,46$ )                        | 1,37<br>( $\pm 0,06$ ) | 4,00<br>( $\pm 3,56$ )                        | 0,90<br>( $\pm 0,85$ ) |
| Gesamt-<br>ausbeute | 8,70<br>( $\pm 1,58$ )                        | 5,00<br>( $\pm 0,49$ ) | 23,53<br>( $\pm 13,18$ )                      | 5,00<br>( $\pm 2,06$ ) | 9,46<br>( $\pm 1,36$ )                        | 5,00<br>( $\pm 0,27$ ) | 19,65<br>( $\pm 8,98$ )                       | 5,00<br>( $\pm 2,23$ ) |

**Tab. VII-13: Veränderungen in der *E. coli* Membran durch die Fettsäure-Desaturasen *BsDesA* und *SaDesA*.** Standardabweichungen in Klammern. (n.n. = nicht nachweisbar; Abs. = absolute Ausbeute; Norm. = Ausbeute normalisiert auf eine Gesamtausbeute von  $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ; put. = putativ)

| Komponente                    | BL21(DE3)                                     |                        | BL21(DE3)                                     |                        | BL21(DE3)                                     |                        |
|-------------------------------|---|------------------------|---|------------------------|---|------------------------|
|                               | (pRhotHi-2)                                   |                        | (pRhotHi-2- <i>BsdesA</i> )                   |                        | (pRhotHi-2- <i>SadesA</i> )                   |                        |
|                               | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        | [ $\mu\text{g L}^{-1} \text{OD}_{660}^{-1}$ ] |                        |
|                               | Abs.  | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  | Abs.  | Norm.                  |
| $\leq \text{C15:0}$           | 0,09<br>( $\pm 0,01$ )                        | 0,12<br>( $\pm 0,01$ ) | 0,47<br>( $\pm 0,73$ )                        | 0,64<br>( $\pm 0,59$ ) | 0,76<br>( $\pm 0,95$ )                        | 0,67<br>( $\pm 0,49$ ) |
| C14:0                         | 0,08<br>( $\pm 0,06$ )                        | 0,11<br>( $\pm 0,09$ ) | 0,07<br>( $\pm 0,11$ )                        | 0,03<br>( $\pm 0,05$ ) | 0,09<br>( $\pm 0,15$ )                        | 0,03<br>( $\pm 0,04$ ) |
| C16:0                         | 1,75<br>( $\pm 0,12$ )                        | 2,51<br>( $\pm 0,08$ ) | 1,54<br>( $\pm 0,55$ )                        | 1,32<br>( $\pm 0,62$ ) | 3,49<br>( $\pm 0,72$ )                        | 2,04<br>( $\pm 0,70$ ) |
| C16:1 $\Delta 5$ (put.)       | n.n.  | n.n.                   | 0,85<br>( $\pm 0,30$ )                        | 0,69<br>( $\pm 0,21$ ) | 0,02<br>( $\pm 0,01$ )                        | 0,01<br>( $\pm 0,01$ ) |
| C16:1 $\Delta 9$              | 0,35<br>( $\pm 0,00$ )                        | 0,50<br>( $\pm 0,01$ ) | 0,51<br>( $\pm 0,15$ )                        | 0,43<br>( $\pm 0,17$ ) | 0,72<br>( $\pm 0,08$ )                        | 0,45<br>( $\pm 0,23$ ) |
| unidentifizierte<br>Fettsäure | 0,33<br>( $\pm 0,07$ )                        | 0,47<br>( $\pm 0,08$ ) | 0,33<br>( $\pm 0,07$ )                        | 0,29<br>( $\pm 0,14$ ) | 0,54<br>( $\pm 0,05$ )                        | 0,33<br>( $\pm 0,14$ ) |
| C18:0                         | 0,08<br>( $\pm 0,06$ )                        | 0,12<br>( $\pm 0,09$ ) | 0,53<br>( $\pm 0,56$ )                        | 0,30<br>( $\pm 0,17$ ) | 0,86<br>( $\pm 1,21$ )                        | 0,30<br>( $\pm 0,30$ ) |
| C18:1 $\Delta 11c$            | 0,82<br>( $\pm 0,05$ )                        | 1,17<br>( $\pm 0,03$ ) | 2,58<br>( $\pm 2,87$ )                        | 1,50<br>( $\pm 0,84$ ) | 3,37<br>( $\pm 3,47$ )                        | 1,43<br>( $\pm 0,61$ ) |
| C18:2 $\Delta 5, 11c$ (put.)  | n.n.  | n.n.                   | 0,07<br>( $\pm 0,06$ )                        | 0,07<br>( $\pm 0,06$ ) | 0,06<br>( $\pm 0,06$ )                        | 0,05<br>( $\pm 0,04$ ) |
| Gesamtausbeute                | 3,49<br>( $\pm 0,37$ )                        | 5,00<br>( $\pm 0,39$ ) | 7,04<br>( $\pm 5,54$ )                        | 5,00<br>( $\pm 2,72$ ) | 9,98<br>( $\pm 6,78$ )                        | 5,00<br>( $\pm 2,44$ ) |







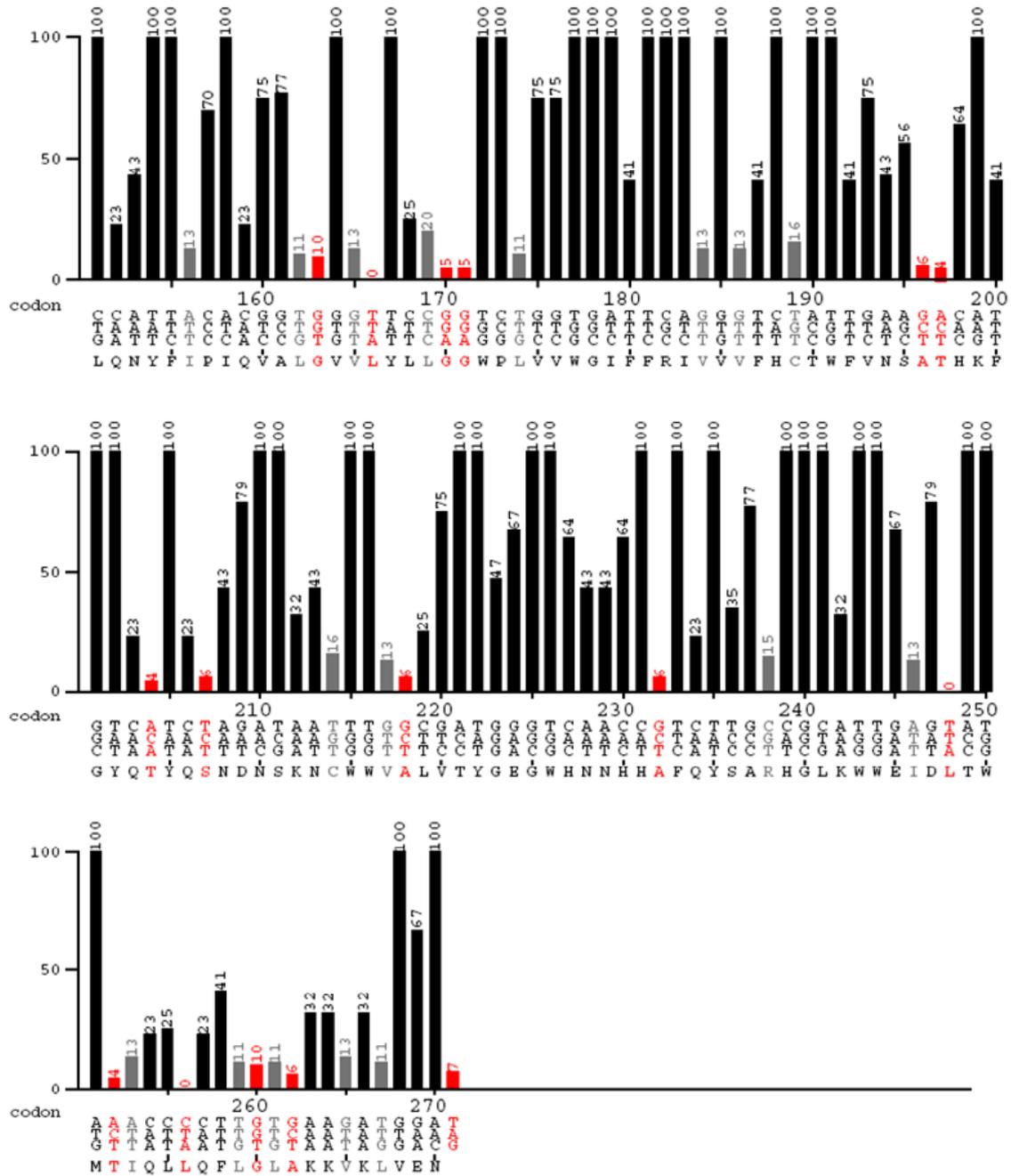
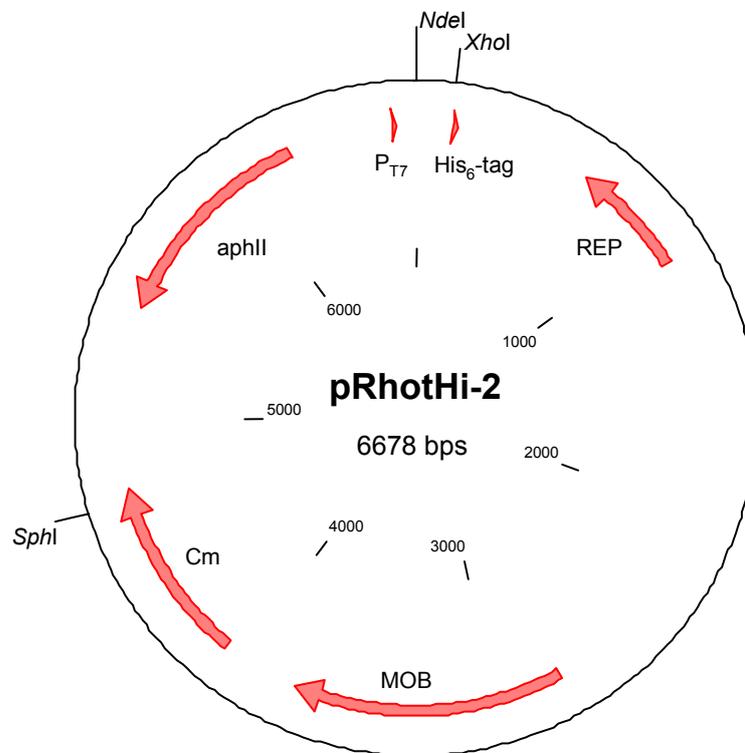
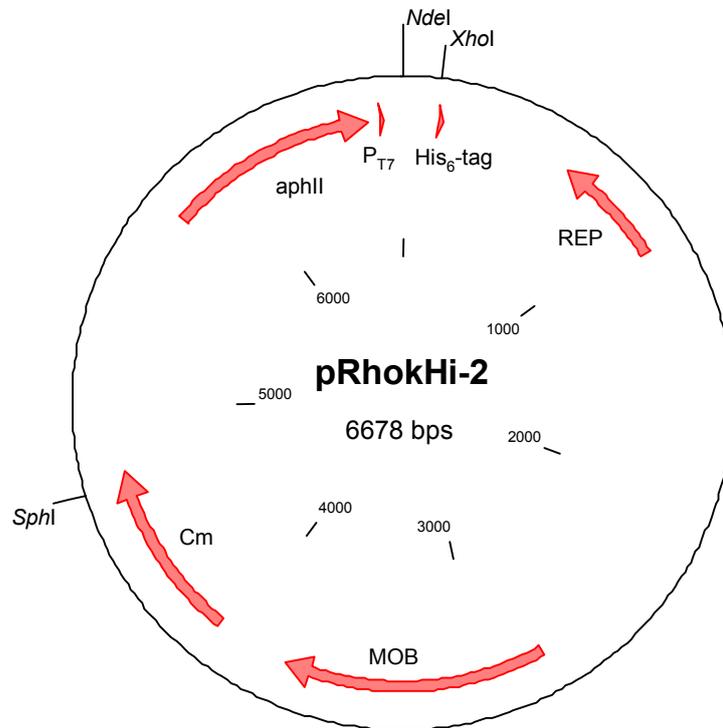
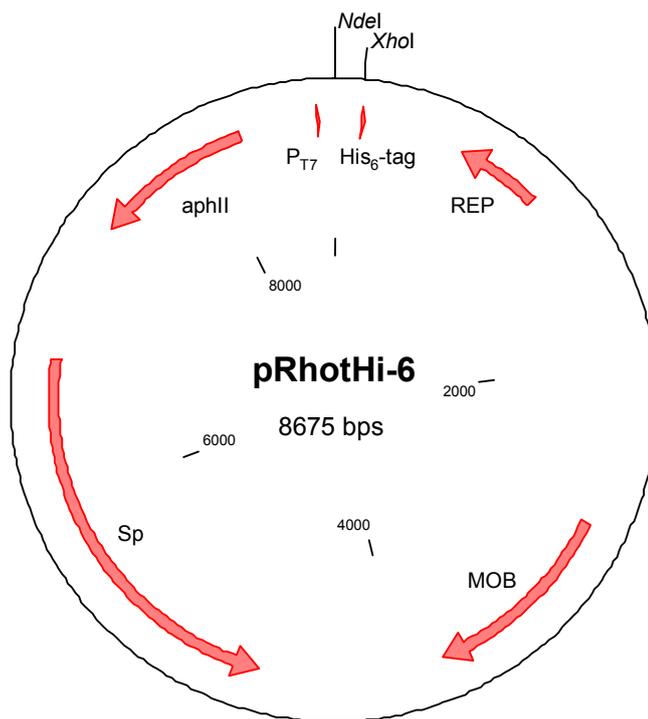
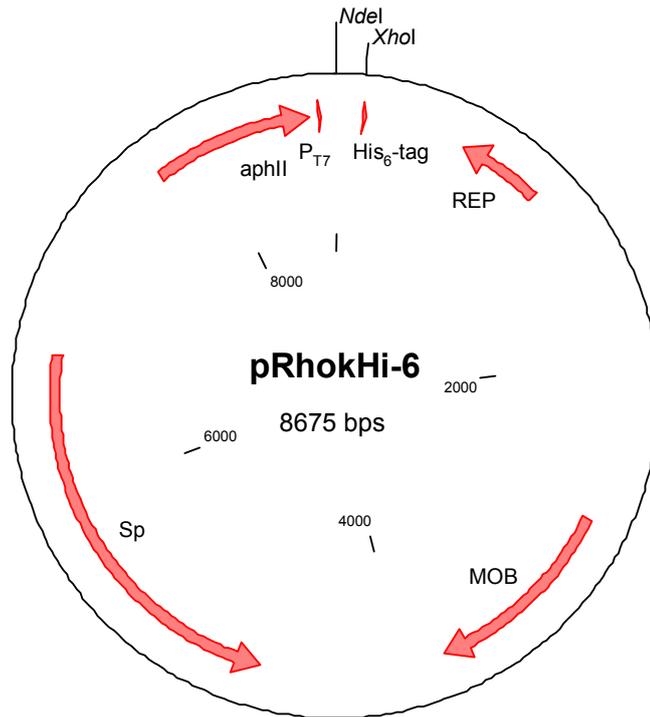
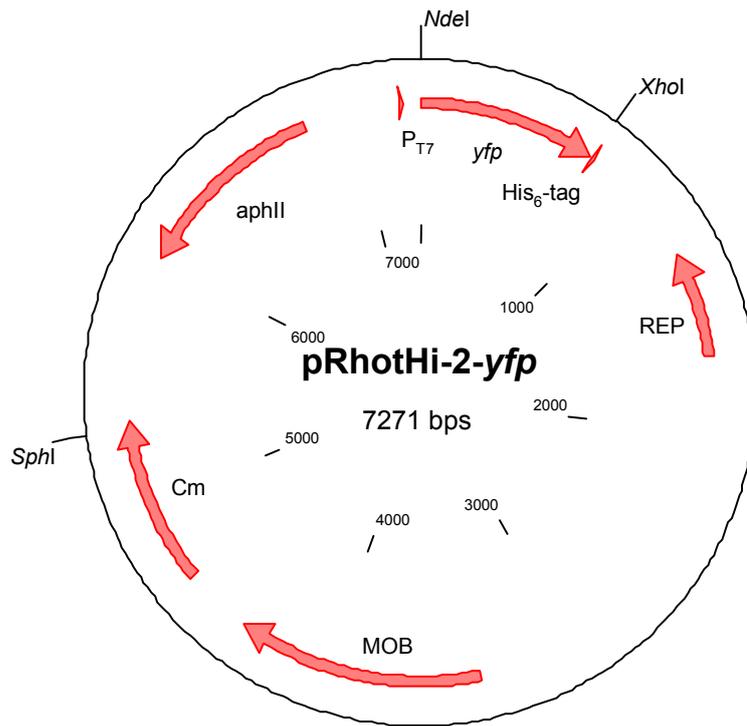
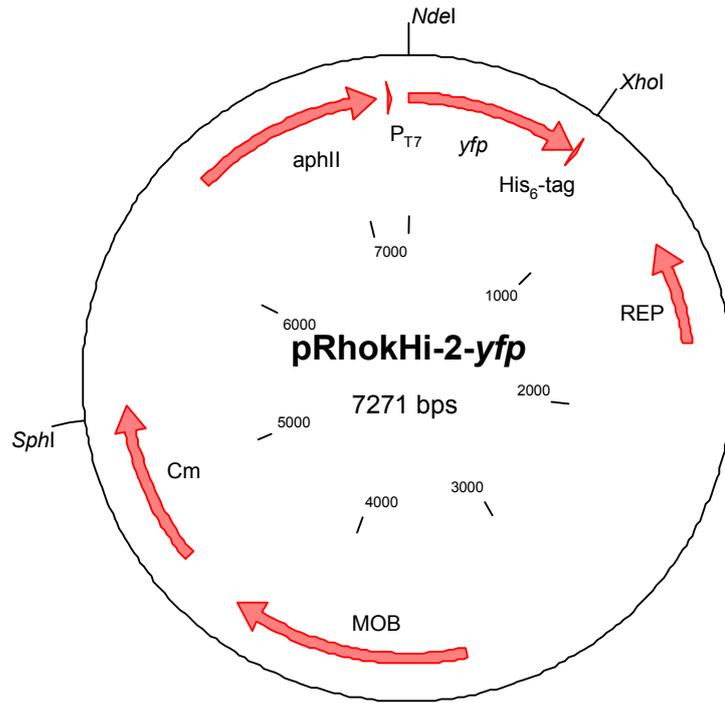


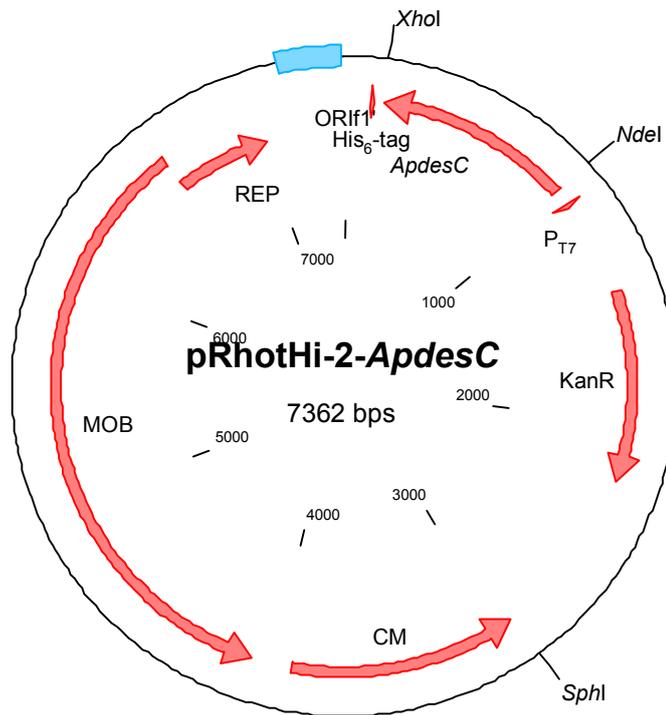
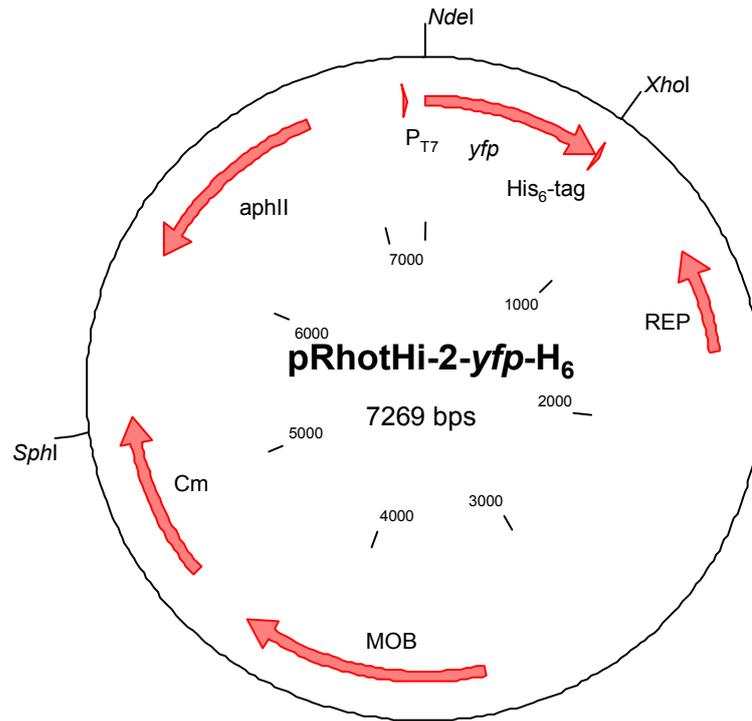
Abb. VII-4: Seltene Codons im Gen *ApdesC* anhand der Codon-Usage von *R. capsulatus* (Fortsetzung)  
 Siehe vorherige Seite.

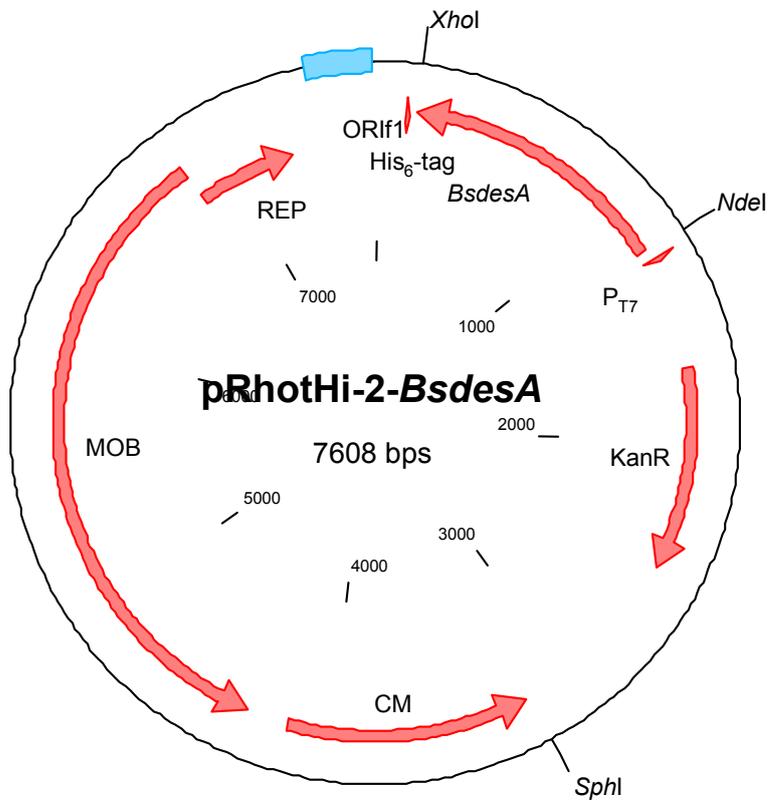
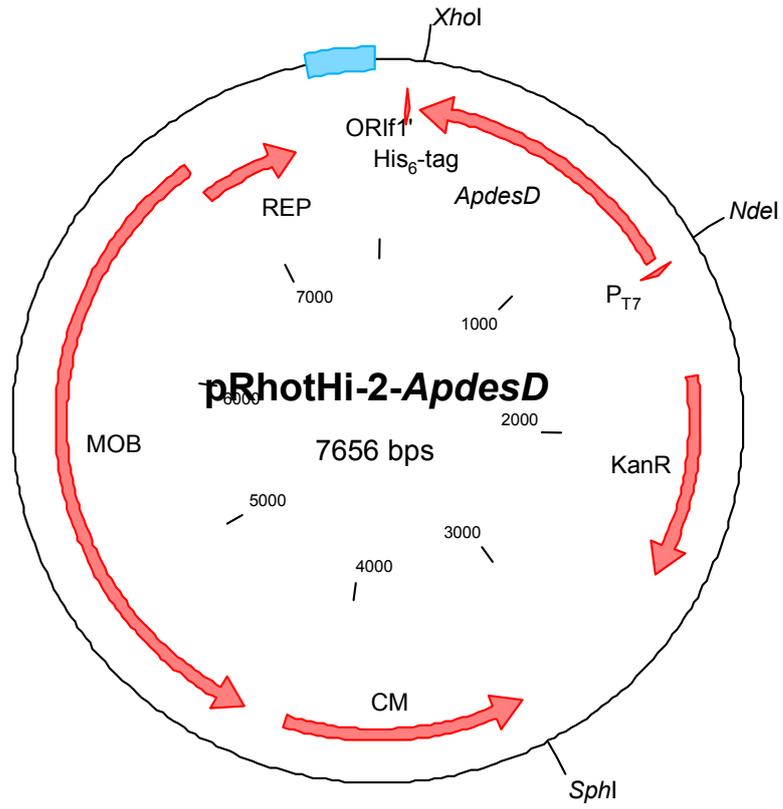
### 3. Karten der verwendeten und erzeugten Plasmide

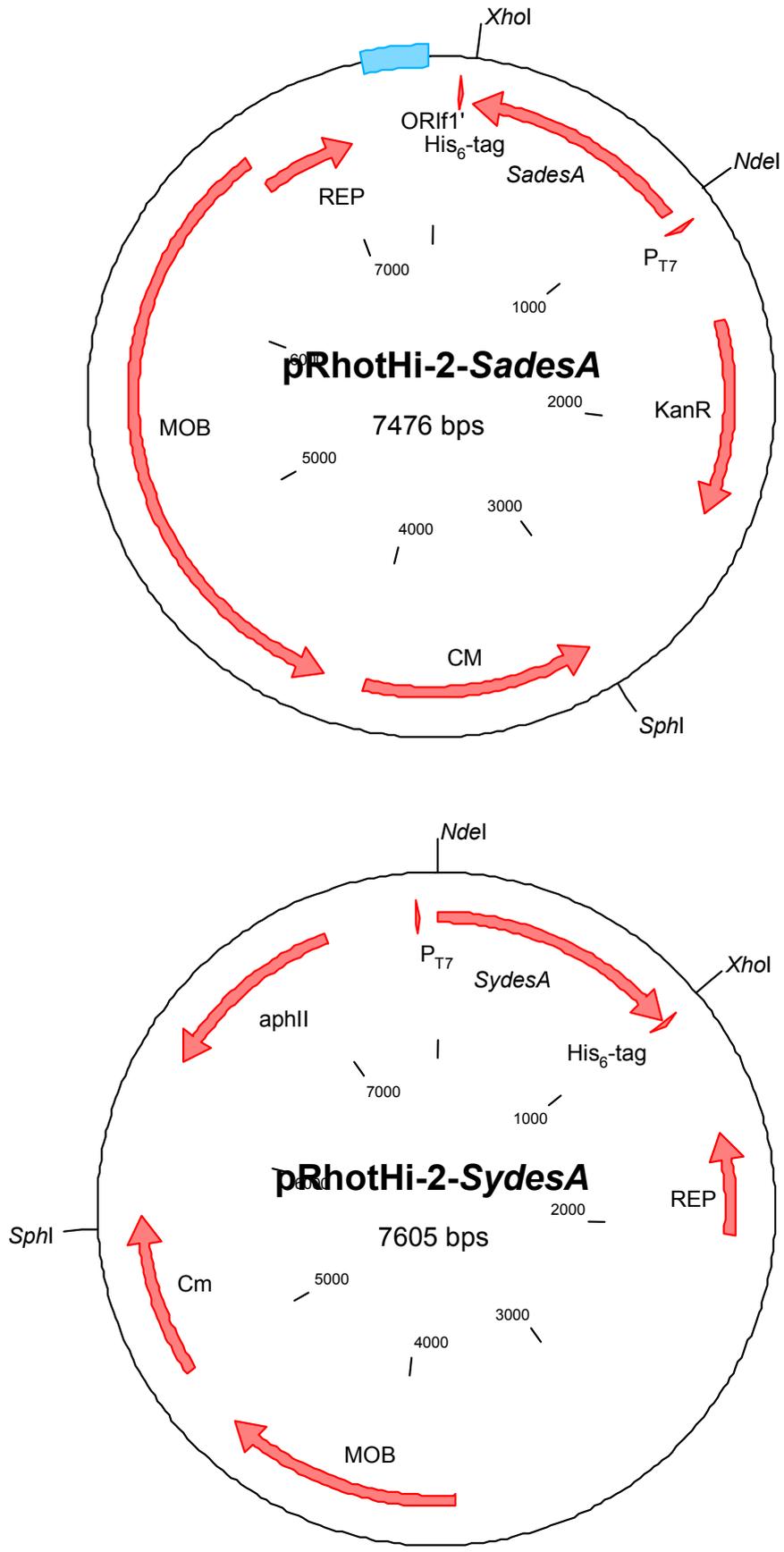


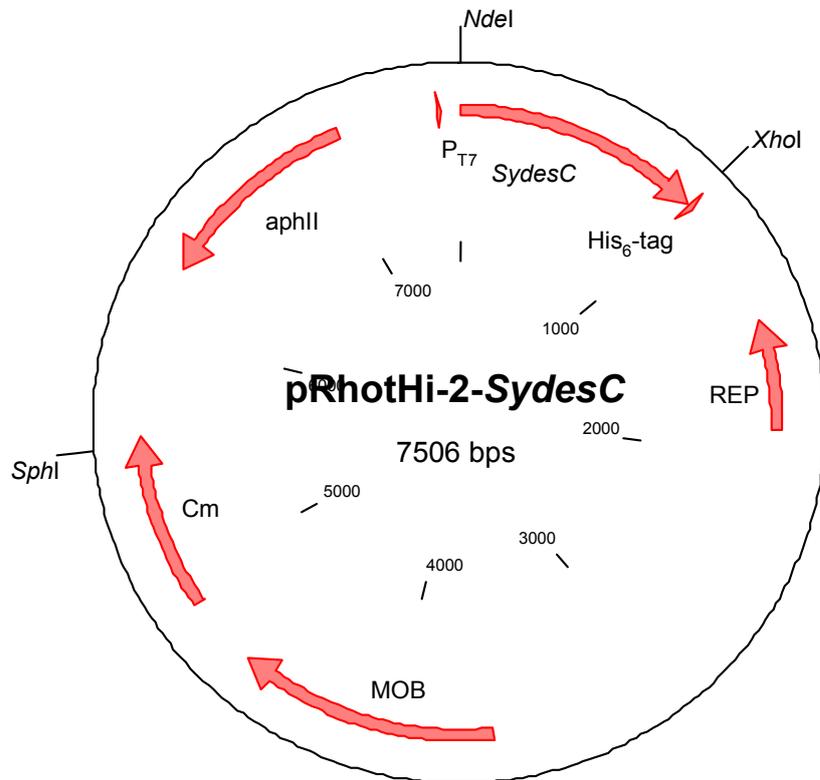
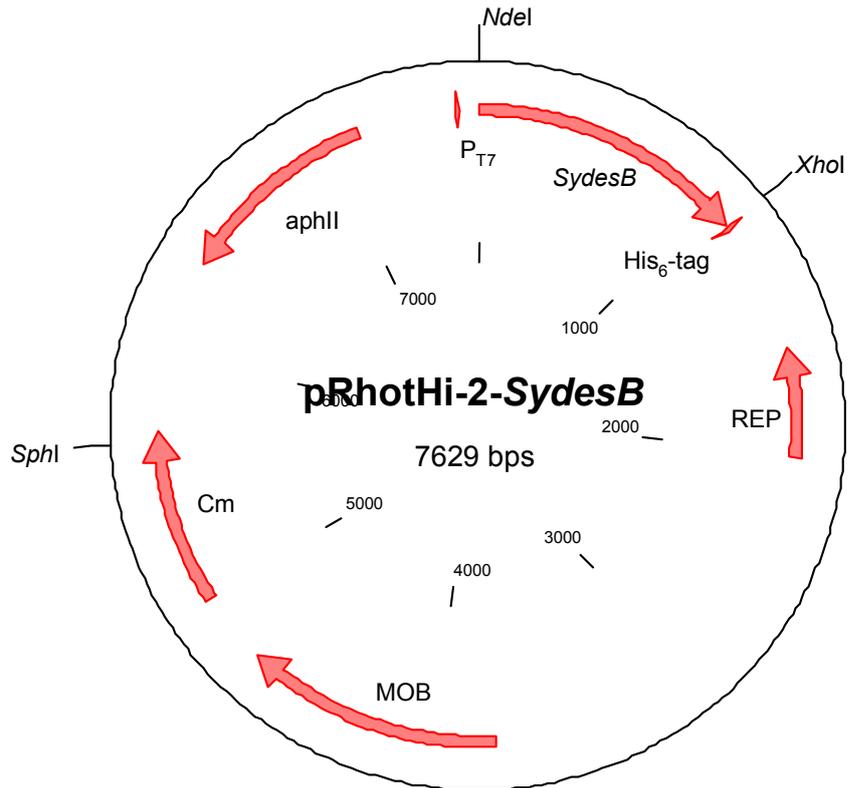


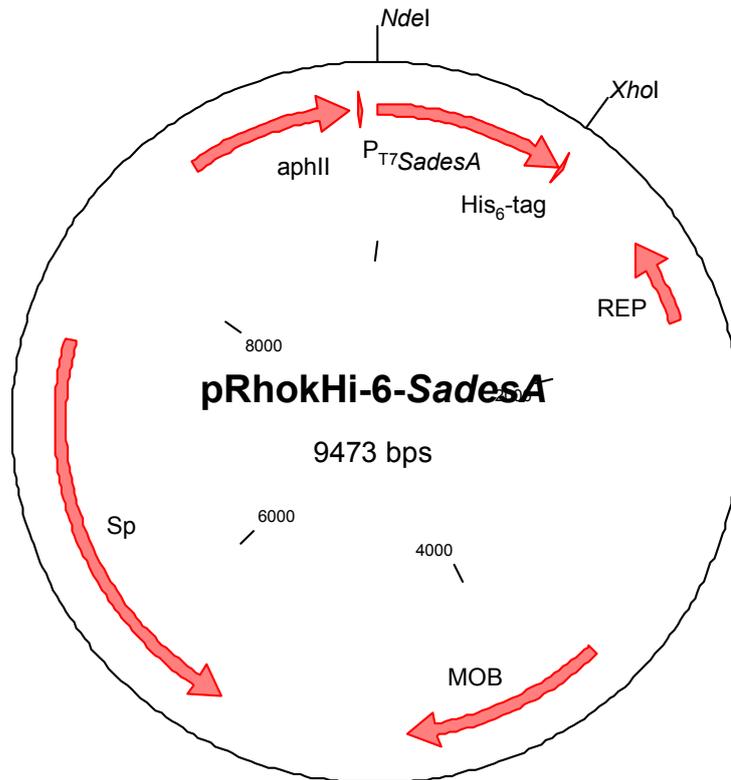
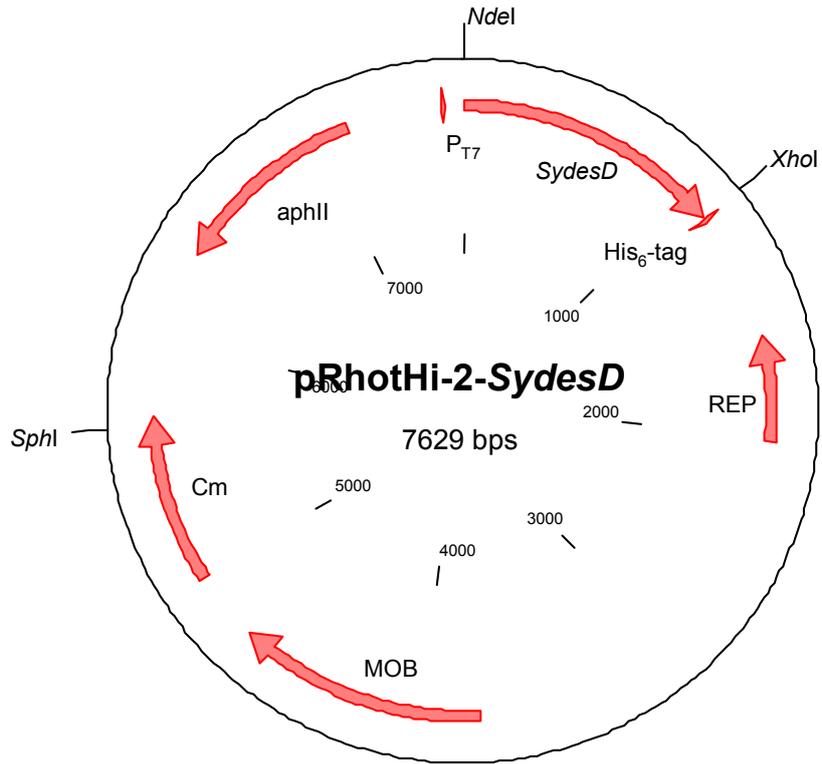












#### 4. Sequenzen der Fettsäure-Desaturase-Gene

***Arthrospira platensis* Desaturase DesC (*ApDesC*) (Accession-# CAA05166)**

ATGACGATTGCAACTGAAACCAAACCTCAAACCTCGACTGGATGACCATAGTATTTATGGCA  
TTCCTCCACATTGGCGCACTTTTTGTGCTAGTCCCAAGTAATTTTAGCTGGGCTGCAGTT  
GGTCTGGCTTTATTTTTGCACTGGGTAACCTGGTGGCTTAGGAATTACCCTAGGGTTTCAC  
CGCTTAATCACCCACCGCAGTTTTGAAACTCCCAAATGGCTAGAATATTTCTTGGCTTTT  
TGCGGCACTTTAGCCTGTCAAGGAGGACCTATCCAGTGGGTCCGTTTACACCGTATGCAC  
CATCTGTACTCTGATCAAACCCTTGACCCCCACGACTCTAACAAGGGTTTTTGGTGGAGT  
CACATGGGTGGATGTTGCGGGAATTCCTGCTGATGCTGATGTTCCCCGCTTTACAAA  
GATATCAACGAAGACCCAGTTTATCTGTTCCCTGCAAAATTATTTCAATCCCATCCAAGTC  
GCCTGGGTGTGGTTTTATATCTTCTCGGAGGATGGCCGTTGGTCGTCTGGGGCATCTTT  
TTCCGCATCGTTGTGGTTTTTCATTGTACCTGGTTTTGTCAATAGCGCTACTCACAAGTTT  
GGCTATCAAACATATCAATCTAATGATAACTCGAAAAATTGTTGGTGGGTGCTCTTGTC  
ACCTATGGGGAAGGCTGGCACAATAATCACCATGCTTTCCAATATTCCGCCCGTCATGGC  
CTGAAATGGTGGGAAATTGATTTAACCTGGATGACTATTCAACTTCTACAATTTTTGGGT  
TTGGCTAAAAAAGTTAAATTGGTGGAAAACTAG

***Arthrospira platensis* Desaturase DesD (*ApDesD*) (Accession-# CAA60573)**

ATGACATCAACAACGTCAAAAAGTAACTTTTTGGGAAAAGTATTGGGTTCCGCAAAGAGCTA  
AATCGTCGAGTAAACGCTTATTTGGGAAGCGGAGAATATTTCCCTCGTGATAACCCGCC  
ATGTACCTGAAAACAGCAATATTTTGGCTTGGGTAGTATCAGCTTGGACCTTCGTGGTT  
TTTGGTCCTGATGTGCTATGGATGAAACTACTGGGTTGCATTGTTTTAGGTTTTGGAGTT  
TCCGCCGTCGTTTTAACATTAGCCATGACGGAAATCATGGAGGTTATTCTAAATATCAA  
TGGGTGAATTATCTATCTGGATTAACCCATGATGCGATCGGAGTTTCTAGTTATTTATGG  
AAGTTTCGCCACAATGTACTTCATCATACTACACCAACATTTTAGGTCATGATGTGGAA  
ATTCATGGGGATGAATTGGTGC GGATGTCTCCTAGCATGGAATATCGGTGGTATCATCGC  
TATCAACATTGGTTCATTTGGTTTTGTCTATCCGTTTATCCCCTACTATTGGTCTATAGCA  
GATGTGCAAACTATGCTATTTAAGCGCAATATCATGACCACGAAATCCCTCCCCGACA  
TGGGTAGATATAGCAACCTTACTCGCCTTTAAAGCCTTCGGTGTGGCTGTGTTTTTAATT  
ATACCGATCGCCGTTGGTTATTCTCCCTTAGAAGCAGTTATCGGCGCTTCTATTGTTTAT  
ATGACCCATGGACTGGTCGCTGTGTCGATTTTATGTTAGCCCATGTCATTGAACCGGCG  
GAATTTTTAGACCCCGACAATTTACACATTGATGATGAATGGGCGATCGCACAAGTAAAA  
ACCACCGTTGATTTTGCCCCAACCAACCAATTATTAAGTGGTATGTAGGGGGATTAAAC  
TATCAAACCGTCCACCATCTATTTCCCTCATATCTGCCACATCCATTATCTAAAATTGCT  
CCGATTTTAGCAGAAGTTTGTGAAGAATTTGGGGTTAATTATGCCGTACATCAAACCTTT  
TTTTGGTGCTTTAGCTGCTAACTATAGCTGGCTGAAAAAAATGTCCATCAACCCGAAACA  
AAAGCGATCGAGCAGTTAACTGTTTAA

***Bacillus subtilis* Desaturase DesA (BsDesA) (Accession-# AAC38355)**

ATGACTGAACAAACCATTGCACATAAAACAAAAACAGCTGACAAAGCAAGTCGCTGCATTT  
GCTCAGCCTGAAACAAAAACAGCCTGATTCAGCTTTTAAACACGTTTATCCCATTCTTC  
GGCCTATGGTTTCTTGCTTATCTCAGCCTCGATGTCTCCTATCTTCTTACGTTAGCATT  
ACGGTGATTGCCGCAGGTTTTCTGACAAGAATTTTTATCATCTTCCATGACTGCTGCCAT  
CAATCTTTTTTCAAACAAAAACGCTATAACCACATTCTCGGTTTTCTGACAGGTGTCTG  
ACTTTATTCCCGTATCTTCAATGGCAGCACAGCCATTTCGATTCATCATGCAACTAGCAGC  
AATCTGGATAAACGCGGAACAGGAGACATCTGGATGTTAACAGTAAACGAATATAAAGCT  
GCATCCAGACGAACAAAGCTTGCATACAGACTTTATAGAAACCCGTTTATCATGTTTATT  
CTCGGACCGATTTATGTTTTCTGATCACGAACCGTTTTAACAAAAAAGGCGCAAGACGC  
AAGGAACGTGTAAACACATACCTTACGAATCTGGCAATTGTCGCGTTGGCTGCCGCTGC  
TGTCTGATCTTTGGCTGGCAATCGTTTTACTGGTGCAAGGCCGATATTTCTGATTTCA  
GGTTCAATCGGTGTTTGGCTGTTTTATGTGCAGCATACCTTTGAAGATTCTTATTTTGAA  
GCGGATGAAAACCTGGAGCTACGTTACGGCTGCTGTTGAAGGCAGCTCATTTTATAAACTC  
CCGAAAACCTGCTTCAATGGCTAACAGGCAATATTGGTTACCACCACGTTTCATCATTTGAGT  
CCAAAGGTGCCTAACTATAAGCTTGAAGTTGCTCATGAACATCACGAACCATTAATAAAC  
GTACCGACAATCACCTTAAAAACAAGCCTGCAATCACTTTCGTTCCGTTCTATGGGATGAA  
GATAACAAACAGTTTGTGTCATTTTCGGGCTATAAAACATATACCTGTAAGCCTTCCGCCT  
GATTCACCAGAAAAACAGAAGCTGCGGAAGAATGCCTGA

***Stappia aggregata* Desaturase DesA (SaDesA) (Accession-# ZP\_01545142)**

TTGGAACCTGGCGATCACGGCGGTGCCGTTTCGTGCTGTTATGGGGTTTGATCTGGGTTGCA  
GTGGATGCCGTTACTGGATCGGTCTGCTTCTCGCCGTTCCAGCGGCGGGCTTCCCTCGTT  
CGGCTCTTTCTGATCCAGCATGATTGCGGTCACGGTTCATTCTTCCGCCATCGTTAACG  
AACGATTGGGTGCGGCGCGCCATTGGCGTCGTGACGCTGACGCCCTACGATTACTGGCGG  
CGAGCCCACGCACTCCACCATGCGAACTCGGGCAATCTCGAACGTCGTGGCATCGGCGAT  
ATCGACACGCTAACCGTCGATGAGTTTCGGGCTCGGACGCCGTTGCGGCAGCTCCTTTAC  
CGCCTGTACCGGCACCCAATCGTCATGTTTGGCCTCGGGCCGGCCTATCTGTTTCATCCTG  
CGTCAACCGCTGCCGATGGGGCTGATGCGCAGCGGTTTAGCACCGTGGGTGAGTGCCATG  
GCGACGAACATGGCTATCGCGAGCCTTGTGCGAGGAATCATCTGGCTGGTAGGTTTGGGG  
CCGTTCTGCTCGTGCAGATGCCGATCACGCTTATTGCAGCCTCGATCGGCGTTTGGCTA  
TTTTATGTCCAACATCAGTTCGAAGACACATTCTGGGAGCATGACCGCGATTGGAGCTTC  
CACGAGGCGGCGTTGAACGGAAGTTCGCACTATGACCTGCCTGGCATCCTGCGCTGGTTC  
ACGGCTAATATCGGTGTACATCATGTGCATCACCTGTGCGAGCCGGATTCCATATTATCGC  
CTGCCAGAGGCGCTGCGGAACCATCCCGAGCTTCAGAATATCGGCCGCTGACCCTGCTT  
CAGAGCCTCAAACTGTGCGGCTCGTGCTTTGGGATGAAGAGAAACGCCGACTGGTCTCC  
TTCAGAGAGACGCGTGAACCTTGCTTAA

***Synechocystis* Desaturase DesA (SyDesA) (Accession-# BAA18169)**

ATGACTGCCACGATTCCCCCGTTGACACCAACGGTAACGCCAGCAATCCCGATCGCCCG  
ATTGCGGATCTCAAACACTACAAGACATCATTAAAACCCTGCCCAAGGAATGCTTCGAGAAA  
AAAGCGAGCAAAGCCTGGGCTTCTGTTTTGATTACCCTAGGGGCGATCGCCGTGGGCTAT  
TTGGGCATTATTTATCTGCCCTGGTACTGCTTGCCCATTACCTGGATCTGGACAGGGACA  
GCCTTAACGGGGGCCTTCGTTGTCGGCCATGACTGTGGCCATCGCTCCTTTGCTAAAAAA  
CGCTGGGTCAATGATTTAGTGGGACATATCGCTTTTGCTCCCCTCATCTACCCTTTCCAT  
AGCTGGGCGCTACTCCACGACCACCATCACCTCCACACCAACAAAATTGAGGTTGATAAC  
GCCTGGGATCCCTGGAGTGTGGAAGCTTTCOAAGCCAGCCCGGCGATCGTCCGGCTTTTT  
TATCGGGCCATCCGGGGTCCCTTCTGGTGGACTGGTTCCATTTTCCATTGGAGCTTAATG  
CACTTCAAACCTTTCOAACCTTGCCCAAAGGGACCGCAATAAAGTCAAATTATCCATTGCC  
GTTGTCTTCTGTTTGC GGCGATCGCTTTCCTGCCCTAATTATCACCACAGGGGTGTGG  
GGTTTCGTCAAATTTTGGCTAATGCCCTGGTTGGTGTATCACTTTTGGATGAGCACTTTT  
ACCATTGTGCACCACACCATTTCCGAAATTCGTTTCCGTCCCGCCGCCGATTGGAGTGCC  
GCCGAAGCCCAGTTAAATGGTACTGTTCACTGCGATTATCCCCGTTGGGTGGAAGTGCTC  
TGCCATGACATCAACGTCCATATTCCCCACCACCTCTCCGTTGCCATCCCTTCCTATAAC  
CTACGACTAGCCACGGAAGTTTAAAAGAAAACCTGGGGACCTTTTCTTTACGAGCGCACC  
TTTAACTGGCAATTAATGCAACAAATTAGTGGGCAATGTCATTTATATGACCCCGAACAT  
GGTACCGCACCTTCGGCTCCCTGAAAAAAGTTTAA

***Synechocystis* Desaturase DesB (SyDesB) (Accession-# NC\_000911)**

GTGCGTCTAGAAATTTTCATCGCCTCAAACAAAGCTTCCCTTACCCCAAAACTGAAGAATTA  
CCATTTACCCTCCAAGAGCTCAGAAACGCTATTCCAGCGGATTGTTTTGAGCCATCGGTA  
GTCCGGTCCCTGGGCTACTTTTTTTTTGGATGTTGGTTTAAATTGCCGGGTTTTATGCTCTA  
GCGGCCTACCTTGATTCTGGTTCCTTCTATCCGATTTTTTGGTTAATTCAGGGAAACCCTA  
TTCTGGTCCCTGTTTGTGGTGGGCCATGATTGTGGCCATGGCTCCTTTTCCAAATCCAAA  
ACCCTTAATAATTGGATTGGTCATCTCAGCCACACGCCAATTTTGGTGCCTTACCATGGC  
TGGCGTATTAGTCATCGTACTCACCATGCCAACACGGGCAATATCGACACCGACGAAAGT  
TGGTATCCAGTGTCCGAGCAAAAATATAACCAAATGGCCTGGTATGAAAAACTTCTACGT  
TTTTACTTGCTCTGATCGCCTACCCCATTTATCTATTTTCGGCGATCGCCAAACCGGCAA  
GGCTCCCATTTCATGCCCGGCAGTCCCCTATTCCGTCCCGGAGAAAAAGCAGCTGTTCTC  
ACCAGCACCTTTGCCCTTGCAGCCTTTGTGGCTTCCTTGGCTTTTTAACTTGGCAATTT  
GGCTGGCTATTTTTGCTGAAATTTTATGTTGCCCCCTACCTCGTGTTTGTGGTGTGGTTA  
GATTTGGTCACATTTTTACATCACACTGAAGACAATATCCCTTGGTATCGTGGTGATGAC  
TGGTATTTTTCTCAAAGGTGCCCTCTCCACCATTGATCGGGATTACGGCTTCATTAACCCC  
ATTCACCATGACATTGGCACCCACGTCGCCACCATATTTTCTCGAATATGCCCCACTAC  
AAGTTACGCCGGGCGACTGAAGCCATCAAGCCCATTTTAGGGGAATATTATCGATATTCT  
GACGAGCCAATTTGGCAAGCTTTTTTTAAGTCCTACTGGGCTTGCCATTTTGTTCCTAAT  
CAAGGTTACGGGTCTATTACCAATCCCCATCCAATGGTGGATATCAAAGAAACCTTAA

***Synechocystis* Desaturase DesC (SyDesC) (Accession-# BA000022)**

ATGTTAAACCCATTA AACATTGAATACCTATATTTAAGCAAAC TTTTGGACAATAGTTTA  
ATCGTTTTTAACAAGCGCCAATTATCCGTTTTTTTCGTTAGGTTTTTTTCATGACTGCT  
GCTCTTCCCAACGATTCCAAGCCCAAGTTGACTCCAGCTTGGACTGTGATCTTCTTTTTT  
ACCTCCATTCAATTTGGTGGCCCTGTTGGCTTTCCTGCCCCAGTTTTTCAGTTGGAAAGCA  
GTGGGGATGGCTTTCTTGCTCTATGTAATTACCGGCGGCATTGGCATTACTTTAGGTTTT  
CACCGTTGTATTTCCCACCGCAGTTTCAATGTTCTAAATGGTTAGAGTATATTTTCGTA  
ATCTGTGGCACCCTAGCCTGTCAGGGGGGCGTATTTGAGTGGGTCGGCTTACACCGTATG  
CACCACAAATTTTCTGACACCACCCCGGATCCCCACGATTCTAATAAGGGTTTTTGGTGG  
AGTCACATCGGCTGGATGATGTTGAAATTCCTGCTAAAGCTGATATTCCCCGCTACACC  
AAGGATATCCAAGACGATAAATTTTATCAATTTTGCCAGAATAATCTAATTCTTATCCAG  
GTCGCCCTAGGCTTGATTTTATTTGCCTTAGGGGGCTGGCCCTTCGTTATTTGGGGCATT  
TTTGTCCGCCTAGTGTTTGTTCCTACTTCACTTGGTTTGTCAACAGTGCCACCCATAAG  
TTCGGCTACGTTAGCCATGAATCCAATGATTATTCCC GCAATTGTTGGTGGGTAGCATTG  
TTAACTTTCGGTGAAGTTGGCACAATAATCACCACGCCTATCAGTACTCTGCTCGCCAT  
GGTTTGCAATGGTGGGAAGTGGATTTAACTTGGATGACCATTAAATTCCTATCTTTGCTG  
GGGTTAGCCAAGGATATTA AACTTCTCCGGAAACTGCGATGGCCAACAAAGCCTAG

***Synechocystis* Desaturase DesD (SyDesD) (Accession-# BAA18502)**

ATGCTAACAGCGGAAAGAATTA AATTTACCCAGAAACGGGGGTTTCGTCGGGTA CTA AAC  
CAACGGGTGGATGCCTACTTTGCCGAGCATGGCCTGACCCAAAGGGATAATCCCTCCATG  
TATCTGAAAACCCTGATTATTGTGCTCTGGTTGTTTTCCGCTTGGGCCTTTGTGCTTTTT  
GCTCCAGTTATTTTTCCGGTGC GCCTACTGGGTTGTATGGTTTTGGCGATCGCCTTGGCG  
GCCTTTTCCTTCAATGTCCGCCACGATGCCAACCAATGCCTATTCTCCAATCCCCAC  
ATCAACCGGGTCTGGGCATGACCTACGATTTTGTCCGGTTATCTAGTTTTCTTTGGCGC  
TATCGCCACA ACTATTTGCACCACACCTACACCAATATCTTGGCCATGACGTGGAAATC  
CATGGAGATGGCGCAGTACGTATGAGTCCTGAACAAGA ACATGTTGGTATTTATCGTTTC  
CAGCAATTTTATAATTTGGGGTTTATATCTTTTCATTCCCTTTTATTGGTTTCTCTACGAT  
GTCTACCTAGTGCTTAATAAAGGCAAATATCACGACCATAAAAATTCCTCCTTTCCAGCCC  
CTAGAATTAGCTAGTTTGCTAGGGATTAAGCTATTATGGCTCGGCTACGTTTTTCGGCTTA  
CCTCTGGCTCTGGGCTTTTCCATTCTGAAGTATTAATTGGTGCTTCGGTAACCTATATG  
ACCTATGGCATCGTGGTTTGCACCATCTTTATGCTGGCCCATGTGTTGGAATCAACTGAA  
TTTCTCACCCCGATGGTGAATCCGGTGCCATTGATGACGAGTGGGCTATTTGCCAAATT  
CGTACCACGGCCAATTTGCCACCAATAATCCCTTTTGGAACTGGTTTTGTGGCGGTTTA  
AATCACCAAGTTACCCACCATCTTTCCCAATATTTGTCATATCACTATCCCAATTG  
GAAAATATTATTAAGGATGTTTGCCAAGAGTTTGGTGTGGAATATAAAGTTTATCCCACC  
TTCAAAGCGGCGATCGCCTCTAACTATCGCTGGCTAGAGGCCATGGGCAAAGCATCGTGA

## Lebenslauf

### Nadine Katzke

Diplom-Biologin

\* 21. Januar 1980

ledig, keine Kinder

### Schulbildung

**1986-1990**

Ev. Grundschule an der Zastrowstraße in Mülheim

**1990-1999**

Elsa-Brändström-Gymnasium in Oberhausen

Abschluss: Abitur

### Hochschulbildung

**1999-2004**

Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

**2005-2006**

Abschluss des Diplomstudiengangs Biologie

Thema der Diplomarbeit: „Entwicklung eines neuen Systems zur heterologen Expression von Redoxenzymen in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*“

**2006-2010**

Promotionsstudium am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich

Thema der Dissertation: „Entwicklung eines *Rhodobacter*-basierten Systems zur Synthese wirtsfremder Proteine und Phospholipide“

### Sprachkenntnisse

Englisch (fließend)

### Private Interessen

Radfahren

Lesen, Kinofilme

### Sonstiges

Führerschein Klasse 3

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 18. Mai 2010

Nadine Katzke